

Aus dem Veterinär-Pathologischen Institut
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. E. Weiß

**Histometrische Untersuchungen
an der Epidermis der Maus nach Applikation
von Zigarettenrauchkondensat im Kurzzeitversuch**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität zu Gießen**

Eingereicht von

Klaus Militzer
Tierarzt aus Leipzig

Gießen 1969

Aus dem Veterinär-Pathologischen Institut
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. E. Weiß

**Histometrische Untersuchungen
an der Epidermis der Maus nach Applikation
von Zigarettenrauchkondensat im Kurzzeitversuch**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

Klaus Militzer
Tierarzt aus Leipzig

Gießen 1969

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen

Dekan: Professor Dr. H. Tillmann

Berichterstatter: Professor Dr. E. Weiß



Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juli 1969

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Reaktionen der Mäusehaut auf Behandlung mit chemisch definierten Stoffen im Kurzzeitversuch	2
2.2 Reaktionen der Mäusehaut auf Behandlung mit Zigarettenrauchkondensat im Kurzzeitversuch	7
3. Eigene Untersuchungen	9
3.1 Material und Methodik	9
3.1.1 Versuchsanordnung und Untersuchungsmaterial	9
3.1.2 Histologische Technik	11
3.1.3 Messung der Epidermisfläche	12
3.1.4 Kernzählung	12
3.1.5 Zählung der mitotischen Kerne	14
3.1.6 Statistische Beurteilung der Untersuchungsergebnisse	14
3.2 Ergebnisse	15
3.2.1 Histologische Befunde an der Mäusehaut von Kontrolltieren und mit Zigarettenrauchkondensat behandelten Tieren	15
3.2.2 Ergebnisse der histometrischen Untersuchung der Epidermis bei unbehandelten Mäusen	21
3.2.3 Ergebnisse der histometrischen Untersuchung der Epidermis bei den Mäusen der Gruppen A und B	25
3.2.4 Ergebnisse der Varianzanalyse	40
4. Besprechung der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur	55
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis	64
Lebenslauf	

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle		Seite
1	Übersicht über die zeitliche Folge von Behandlung und Tötung der Versuchstiere	10
2	Beurteilung der histologischen Befunde an Epidermis und Korium bei den Mäusen der Gruppen A und B und bei den Kontrolltieren	16
3	Ergebnisse der histometrischen Untersuchung an der Epidermis der Kontrolltiere - Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -	21
4	Epidermisfläche, Epidermisdicke und Volumenwert der Zellen bei den Mäusen der Gruppe A - Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -	26
5	Ergebnisse der Kernzählung in der Epidermis der Mäuse aus Gruppe A - Gruppenmittelwerte -	27
6	Epidermisfläche, Epidermisdicke und Volumenwert der Zellen bei den Mäusen der Gruppe B - Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -	35
7	Ergebnisse der Kernzählung in der Epidermis der Mäuse aus Gruppe B - Gruppenmittelwerte -	36
8	Vergleich der prozentualen Anteile der Kerntypen an der Gesamtkernzahl in der unbehandelten Mäuseepidermis	55

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung		Seite
1	Häufigkeitsverteilung der Epidermisflächen und der Gesamtkernzahlen pro 50 μ m Epidermislänge bei den Kontrolltieren, N = 300	22
2	Häufigkeitsverteilung der Basal- und Spinosakerne pro 50 μ m Epidermislänge bei den Kontrolltieren, N = 300	23
3	Prozentuale Anteile der Kerntypen (bezogen auf die Gesamtkernzahl) in der Epidermis der Mäuse aus Gruppe A - Gruppenmittelwerte -	25
4	Vergleichende Darstellung der Epidermisdicke und der Gesamtkernzahl in 1000 μ m Epidermislänge für die Gruppen A und B - Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -	32
5	Vergleichende Darstellung der Volumewerte der Zellen für die Gruppen A und B - Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -	33
6	Prozentuale Anteile der Kerntypen (bezogen auf die Gesamtkernzahl) in der Epidermis der Mäuse aus Gruppe B - Gruppenmittelwerte -	34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545909_0014

1. Einleitung

In der Frühzeit der experimentellen Krebsforschung richtete sich das Interesse besonders auf die Gewebsveränderungen, die an der Rückenhaut der Maus nach wiederholten Behandlungen mit karzinogenem Steinkohlenteer entstehen. Solche Langzeitexperimente führen zu Hyperplasie der Epidermis, Papillombildung und Entstehung maligner Hauttumoren. Gleiche Veränderungen lassen sich durch die Behandlung mit aus Steinkohlenteer isolierten oder synthetisierten karzinogenen Kohlenwasserstoffen hervorrufen.

Um den Wirkungsmechanismus karzinogener Substanzen kennenzulernen, wurde die Mäusehaut nach einer oder nach wenigen Behandlungen mit geringen, exakt dosierbaren Karzinogenmengen untersucht. Appliziert wurden vor allem chemisch definierte Karzinogene, besonders häufig Methylcholanthren (MC), Benzpyren (BP) und Dimethylbenzanthracen (DMBA). Als Folge der Behandlung mit diesen Stoffen wurden "sog. unsichere Kriterien für Malignität wie Gewebshyperplasie, Zell- und Kernpolymorphie und -atypie, Kernhyperchromasie, hohe Mitosenzahl und atypische Mitosen" (KLEIN, 1961) beobachtet.

Da Zigarettenrauchkondensat (ZRK) als ein schwaches, aber komplettes Karzinogen wirkt (WYNDER und HOFFMANN, 1968), lassen sich nach wenigen Behandlungen der Mäusehaut mit ZRK ähnliche Veränderungen wie nach Applikation von chemisch definierten Karzinogenen feststellen. Für die Erfassung dieser Vorgänge in der Epidermis sind histometrische Untersuchungsverfahren besonders geeignet.

Mir wurde die Aufgabe gestellt,

- histologische Veränderungen an der Mäusehaut nach Behandlung mit ZRK zu untersuchen,
- festzustellen, ob die Wirkung auf die Mäusehaut von der Dosis des ZRK abhängig ist und
- Veränderungen der Epidermisdicke und der Kernzahlen in der Epidermis histometrisch auszuwerten.

2. Literaturübersicht

2.1 Reaktionen der Mäusehaut auf Behandlung mit chemisch definierten Stoffen im Kurzzeitversuch

Nach einmaliger Applikation von MC oder BP auf die geschorene Rücken-
haut der Maus stellt PULLINGER (1940) eine Zunahme der
Epidermisdicke auf das Zwei- bis Dreifache gegenüber unbe-
handelten Kontrolltieren fest. Die Verdickung der Epidermis
am 2. bis 4. Versuchstag wird vorwiegend durch eine Schwellung
der Spinosakerne und -zellen hervorgerufen. Das Zytoplasma
zeigt zu diesem Zeitpunkt eine hochgradige Vakuolisierung.
Mitosen finden sich einen Tag nach der Behandlung nur ganz
vereinzelt, zwei Tage später aber sehr häufig. Im Korium
werden Hyperämie der Gefäße, geringgradige leukozytäre In-
filtration und Schwellung der kollagenen Fasern beobachtet.
Vom 4. Versuchstag an bilden sich die Epidermishyperplasie
und die entzündlichen Veränderungen im Korium langsam zurück.

Der Schädigungsgrad an Epidermis und Korium ist von der Menge
der applizierten Karzinogene abhängig. Bei einer Reduzierung
der Dosis auf die Hälfte lassen sich histologisch keine Haut-
veränderungen feststellen (PULLINGER, 1941).

GLÜCKSMANN (1945) untersucht den Einfluß einer einmaligen
Behandlung mit BP auf die Zellpopulation der Mäuseepidermis.
Nach dem Aussehen unterscheidet er vier Zelltypen: Mitotische
Zellen von der Pro- bis zur Telophase, degenerierte Zellen,
Ruhezellen als die eigentlichen Basalzellen und differen-
zierte Zellen des Stratum spinosum und granulosum.

In den ersten 24 Stunden nach der Applikation bleiben die
Zellzahlen in der Epidermis unverändert. Vom 2. Versuchstag
an kommt es zu einer beträchtlichen Zunahme der Epidermis-
dicke, die durch Vermehrung und Vergrößerung der Ruhezellen
und der differenzierten Zellen hervorgerufen wird. Zwischen
dem 2. und 15. Versuchstag steigt die Zahl der mitotischen
Zellen deutlich an.

Die Erhöhung der Mitosenzahl wird als ausreichende Erklärung für die Vermehrung der Epidermiszellen und die Zunahme der Epidermisdicke angesehen.

An nur mit Aceton behandelten Mäusen ist weder makroskopisch noch auf Grund von Zellzählungen ein Einfluß der Behandlung zu erkennen.

Zellzählungen in der Epidermis werden auch von SETÄLÄ et al. (1957, 1959), DAMMERT (1957) und MERENMIES (1959) durchgeführt. Diese Autoren weisen auf die Nachteile hin, die der Einteilung der Zelltypen nach GLÜCKSMANN (op. c.) anhaften. Die Abgrenzung der Ruhezellen von den differenzierten Zellen nur auf Grund des Aussehens ist unbestimmt und mehrdeutig. Die Lage der Zellen in den verschiedenen Epidermisschichten, die unterschiedliche Stadien der Entwicklung der Basalzelle zur Hornschuppe darstellen, wird nicht berücksichtigt. Auch sind deutlich ausgebildete Interzellularbrücken und Zellgrenzen kein Zeichen für die Differenzierung einer Zelle, wie GLÜCKSMANN annimmt. Der Reifegrad der Zellen läßt sich besser aus der Lage und Richtung der Zellen in der Epidermis bestimmen (LEBLOND, 1951).

Die Einteilung der Zellen erfolgt bei SETÄLÄ und seinen Schülern deshalb nach ihrer Lage in der Epidermisschicht, ihrem allgemeinen Aussehen und der Orientierung, d.h. der Richtung ihrer Längsachse. Es werden Basalzellen, differenzierte Zellen, mitotische und degenerierte Zellen unterschieden. Die Zellen des Stratum granulosum werden in diesen Zählungen nicht erfaßt, da Granulosazellen bei hochgradiger Hyperplasie schwierig voneinander zu unterscheiden sind und sich die oberflächliche Epidermisschicht bei der Herstellung der Präparate häufig ablöst.

Die genannten Autoren betonen aber, daß die Ergebnisse der Zellzählung, ausgenommen in den unbehandelten Häuten und in Häuten mit initialer Hyperplasie, in großen Zügen mit den Ergebnissen von GLÜCKSMANN zu vergleichen sind.

Um die Epidermisdicke zu bestimmen, zählen SETÄLÄ und Mitarbeiter die Zellagen. MERENMIES mißt die kleinste und größte Höhe des Stratum Malpighi in jedem untersuchten Epidermisabschnitt und errechnet daraus und aus der ausgewerteten Epidermislänge die Epidermisfläche. Er verwendet diese Werte zur Bestimmung der durchschnittlichen Volumene der Zellen.

Die Untersucher gelangen zu gleichartigen Ergebnissen: DMBA führt in den ersten zwei Tagen nach einmaliger Applikation zu einer hochgradigen Verdickung der Epidermis. Die Zellen des Stratum Malpighi sind erheblich vergrößert. Die Kernzahlen in der Epidermis entsprechen denen der unbehandelten Mäuse. Die Mitosenzahl steigt im Laufe des Versuches nicht an, obwohl die Zahl der Basalzellen nach dem 4. Versuchstag deutlich vermehrt ist. Die Epidermishyperplasie nach DMBA-Behandlung wird durch die Mengenzunahme der Basalzellen, deren Reifung verzögert ist, hervorgerufen.

Die Hyperplasie nach einer Applikation von Tween 60 ist dagegen durch die Mengenzunahme der differenzierten Zellen (Spinosazellen) bedingt. Weil die Mitosenzahl im Vergleich zu den Kontrollen gleichzeitig bis auf das Zwanzigfache erhöht ist, wird die Hyperplasie durch eine besonders rasche Differenzierung der Basalzellen ausgelöst.

IVERSEN und EVENSEN (1962) untersuchen die Veränderungen in der Epidermis der Maus mittels Autoradiographie und Mitosenzählung nach der Colchizin-Methode (DUSTIN, 1959). Für die einmalige Behandlung mit MC, BP oder DMBA werden grundsätzlich gleiche Vorgänge in der Epidermis beobachtet: In den ersten 24 Stunden nach der Applikation ist die mitotische Aktivität und die DNS-Synthese der Zellen blockiert. Basal- und Spinosazellen werden irreversibel geschädigt und im Laufe der nächsten Tage zur Epidermisoberfläche abgestoßen. Die hohe Rate der Zellerneuerung, bedingt durch Verkürzung der Mitosedauer und der DNS-Synthese, kompensiert diese Schäden rasch.

Die nach der Applikation auftretende Epidermishyperplasie ist das Ergebnis einer regenerativen Zellerneuerung.

Wird MC in abgestuften Mengen appliziert, so ist eine kritische Dosis festzustellen, bei deren Unterschreitung es nicht zu den typischen Veränderungen der Mitoserate (Mitosenzahl : Mitosedauer und der DNS-Synthese kommt. Oberhalb dieser Schwelle ist der Wirkungsgrad des Karzinogens dosisabhängig.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von Dosis - Wirkungsbeziehungen im Langzeitversuch.

BOCK (1964) weist an drei DMBA-Dosen nach, daß die Zahl der gebildeten Tumoren von der Menge des applizierten Karzinogens abhängig ist.

IVERSEN et al. (1968) finden bei fünf MC-Dosen eine direkte Beziehung zwischen Karzinogenmenge, der Zahl der insgesamt erzeugten Tumoren, der Tumorzahl pro Maus und der Zeitspanne bis zum Auftreten der Tumoren.

ELGJO (1966) studiert die Veränderungen der Mitosedauer und Mitosenzahl nach einmaliger Behandlung mit Karzinogenen und mit nichtkarzinogenen Hyperplasiogenen. Er kritisiert die üblichen Mitosezählungen, die ein völlig falsches Bild ergeben können, falls die Dauer der Mitose nicht exakt bestimmt wird. Denn eine hohe Mitosenzahl ist nur dann ein Indikator für intensive Zellerneuerungs- oder Wachstumsprozesse, wenn die Mitosedauer bekannt ist.

Die Zunahme der Epidermisdicke erklärt ELGJO mit einem geringen, aber beständigen Ansteigen der Mitoserate verbunden mit einer nahezu normalen Zellabstoßung zur Hautoberfläche.

IVERSEN und BJERKNES (1963), IVERSEN (1968) und IVERSEN et al. (1968) erklären die Vorgänge in der Epidermis der Maus nach Karzinogenapplikation mit kybernetischen Begriffen.

Sie verwenden ein mathematisches Modell, mit dem sich verschiedene Einflüsse auf die Epidermiszellpopulation mit Hilfe eines Computers simulieren lassen und vergleichen die Ergebnisse mit beobachteten biologischen Daten. Das Modell der Epidermiszellpopulation arbeitet nach dem negativen Feedback-Prinzip. Die Zellen in der Basalschicht schieben nach jeder Teilung Zellen in das Stratum spinosum. Die Zellen reifen und werden schließlich an die Hautoberfläche abgestoßen. Dabei wird ein chemischer Stoff frei, der zurückdiffundiert und die Zellteilungsaktivität in der Basalschicht reguliert. Entstehen also viele reife Zellen, so wird auch eine reichliche Menge des regulierenden Stoffes gebildet und die Teilung erfolgt mit verminderter Geschwindigkeit. Der Mitosehemmstoff wird epidermales Chalon genannt. Er ist gewebespezifisch, jedoch artunspezifisch.

Wird in das Modell eine einzige Störung eingebracht, die dem Zellschaden nach einmaliger Behandlung der Epidermis mit einem Karzinogen im biologischen Experiment entspricht, so reagieren Modell und lebende Epidermis gleichartig. Nach Zellschädigung und kurzer Blockierung der Zellerneuerung kommt es einen Tag nach der Applikation zu einer um das Dreifache erhöhten Zellerneuerung, die zu einer Epidermis-hyperplasie führt. Wenn in dieser Periode der Proliferation ein normaler Zellverlust bestehen würde, müßte die Hyperplasie früher und stärker ausgeprägt auftreten als dieses beobachtet wird. Die Hyperplasie bleibt geringer als vermutet, weil der Zellverlust stärker ist als in der unbehandelten Epidermis.

Nur die Zellschädigung und Blockierung der Zellteilung sind primäre Effekte der Karzinogenapplikation. Die Steigerung der Zellproliferation und die Entwicklung der Hyperplasie sind sekundäre Vorgänge. Sie entwickeln sich nach IVERSEN notwendigerweise in einem negativen Feedback-System wie der Epidermis als regenerative Prozesse nach einer Verletzung.

2.2 Reaktionen der Mäusehaut auf Behandlung mit Zigarettenrauchkondensat im Kurzzeitversuch

1953 gelingt es WYNDER et al. erstmals, durch häufige Behandlungen mit ZRK Hautkrebs auf der Rückenhaut der Maus zu erzeugen. Später werden ähnliche Versuche in großer Zahl durchgeführt (Zusammenstellung bei WYNDER und HOFFMANN, 1967). Der Einfluß der Dosis des ZRK auf die Tumorzahl wird in Langzeitversuchen eindrucksvoll demonstriert (BOCK et al., 1965).

Auf der Tatsache, daß die Behandlung der Mäusehaut mit Karzinogenen zum Verschwinden der Talgdrüsen und zu einer Zunahme der Epidermisdicke führt, beruht der von SUNTZEFF et al. (1957), GUERIN und CUZIN (1961), KRACHT et al. (1961) zur kurzfristigen Prüfung von Karzinogenen verwendete "Talgdrüsenchwundtest" ("sebaceous gland suppression test") und "Hyperplasie-Test". Die Erhöhung der Dosis eines ZRK (0.05 ml Kondensatlösung) auf das Doppelte kann mit diesem Test sicher nachgewiesen werden. Fraktionen des Kondensates lassen sich auf Grund ihrer Aktivität an der Mäusehaut unterscheiden.

Von LAZAR und Mitarbeitern (1963) werden neben der Beurteilung der Talgdrüsengröße und der Epidermisdicke Kernzählungen in der mit ZRK behandelten Mäuseepidermis durchgeführt. Nach einer Applikation nimmt die Zahl und Größe der Talgdrüsen in den ersten Tagen linear ab und erreicht am 8. Tag nach der Behandlung das Minimum. Die Dicke der Epidermis wächst bis zum 4. Versuchstag rasch an und geht anschließend im Laufe von Wochen zurück.

Die Zellzahl bleibt am ersten und zweiten Versuchstag konstant, nur die Zellen vergrößern sich deutlich. Mit einer Verschiebung um zwei Tage verändert sich die Kernzahl dann parallel mit der Epidermisdicke.

Die genannten Tests werden für die Schnellprüfung ("rapid screening") karzinogener Substanzen verwendet. Sie sind

jedoch relativ unspezifisch und deshalb nur für den Vergleich chemisch ähnlicher Karzinogene geeignet.

DONTENWILL et al. (1965) prüfen mit Hilfe der Autoradiographie, ob der ^3H -Thymidin-Markierungsindex an der Mäusehaut "genauere Aussagen über eine potentielle cancerogene Aktivität von Stoffen und Stoffgemischen erlaubt". Die Stärke der DNS-Synthese und damit der Proliferation der Basalzellen nach wenigen Behandlungen mit ZRK ist kein Gradmesser für die karzinogene Aktivität des Kondensates. Die Steigerung der Zellproliferation ist nicht eindeutig dosisabhängig, da erst eine sehr starke Dosiserhöhung eine Zunahme des Markierungsindex bewirkt.

LAZAR et al. (1966) vergleichen die Ergebnisse des "Talgdrüschwund- und Hyperplasie-Tests" mit Langzeitversuchen. Die Verdopplung der Dosis des ZRK führt zu einer signifikanten Zunahme der Tumorrates im Langzeitexperiment, zu einer deutlichen Verminderung der Talgdrüsenzahl und zu einem statistisch gesicherten Anwachsen der Epidermisdicke im Kurzzeitversuch.

ELGJO (1968) untersucht die Änderung der Mitosenzahl und Mitosedauer an vier Zigarettenrauchkondensaten, die im Kurzzeitversuch ("Talgdrüschwund- und Hyperplasie-Test") unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Nach einer Behandlung der Epidermis mit den Kondensaten sind keine quantitativen Unterschiede in der Teilungsaktivität der Epidermiszellen festzustellen. Die Kondensate wirken uniform und nicht so spezifisch wie karzinogene Kohlenwasserstoffe. Bei allen vier Kondensaten erreicht die Mitoserate zwischen dem 2. und 4. Tag den Spitzenwert. Die Dauer der Mitose ist in diesem Zeitraum auf die Hälfte der normalen Mitosedauer von einer Stunde verkürzt. Die ZRK beeinflussen die Wachstumsvorgänge in der Mäuseepidermis wie nichtkarzinogene Stoffe.

Die im "Talgdrüschwund- und Hyperplasie-Test" beobachteten Unterschiede zwischen den Kondensaten lassen sich nicht mit Veränderungen der Wachstumsbedingungen (Mitosedauer, Mitosenzahl) in der Epidermis erklären.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methodik

3.1.1 Versuchsanordnung und Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen werden an weiblichen Albinomäusen durchgeführt.

Stamm: ICI-ASL; Züchter: Edwards, Roebuck Farm,
Welwyn, England;

Durchschnittliches Körpergewicht: 24 g;

Alter der Tiere: 56 ± 5 Tage;

Haltung: zu zehnt in Makrolonkäfigen Typ 4;

Fütterung: Mäusestandardfutter und Wasser ad libitum.

Einen Tag vor Behandlungsbeginn werden allen Mäusen die Rückenhaare bis zur Schwanzwurzel mit einer elektrischen Haarschneidemaschine geschoren. Mäuse mit auch nur leichten Scherverletzungen werden nicht in den Versuch genommen. Drei Versuchsgruppen werden durch Zufallsauswahl gebildet: Je eine Behandlungsgruppe (Gruppe A und Gruppe B) umfaßt 45 Tiere, die Kontrollgruppe C besteht aus 15 Mäusen.

Die Behandlung erfolgt mit dem Rauchkondensat einer handelsüblichen Zigarette. Das Rohkondensat wird unter Standardbedingungen (Zugvolumen 35 ml/Zug; Zugdauer 2 sec.; Zughäufigkeit 1 Zug/min; Stummellänge 23 mm) durch maschinelles Abrauchen gewonnen, in einer Kühlfalle aufgefangen und nachfolgend bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (Trockenkondensat). Das gebrauchsfertige Kondensat enthält für die Behandlungsgruppe A in 0.3 ml Aceton/Wasser (9 : 1) 50 mg Trockenkondensat und für die Gruppe B 25 mg. 0.3 ml Kondensat für Gruppe A enthalten 4.3 mg Nikotin und 25.5 mg Teer. Im Versuch wird nur Kondensat verwendet, das nicht älter als 24 Stunden ist.

Tabelle 1: Übersicht über die zeitliche Folge von Behandlung und Tötung der Versuchstiere

Ver- suchs- tag	GRUPPE A			GRUPPE B			GRUPPE C	
	50 mg Zigarettenrauchkondensat in 0.3 ml Aceton/Wasser (9:1)	Anzahl der behandelten Mäuse	Anzahl der getöteten Mäuse	25 mg Zigarettenrauchkondensat in 0.3 ml Aceton/Wasser (9:1)	Anzahl der behandelten Mäuse	Anzahl der getöteten Mäuse	Kontrolltiere	Anzahl der getöteten Mäuse
1		45	keine		45	keine		
2		40	5 (I)*)		40	5 (I)*)		5
3		35	5 (II)		35	5 (II)		
4			5 (III)			5 (III)		
5			5 (III)			5 (III)		
6			5 (III)			5 (III)		
7			5 (III)			5 (III)		5
8			keine			keine		
9			5 (III)			5 (III)		
10			keine			keine		
11			5 (III)			5 (III)		
12			keine			keine		
13			keine			keine		5
14			5 (III)			5 (III)		

*) Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der Anzahl der Behandlungen

Die Mäuse beider Behandlungsgruppen werden an drei aufeinanderfolgenden Tagen (1., 2. und 3. Versuchstag) mit dem entsprechenden Zigarettenrauchkondensat behandelt. Je Tag und Tier werden 0.3 ml Kondensatlösung mit einer Spritze auf die einen Tag vor Beginn der Behandlung geschorene Rückenhaut aufgetragen. Dabei wird ein Hautgebiet von ca. 3 cm x 3 cm möglichst gleichmäßig mit Kondensat bedeckt. Alle wesentlichen Einzelheiten über die zeitliche Folge von Behandlung und Tötung sind der Tabelle 1, Seite 10, zu entnehmen. Behandlung und Tötung der Mäuse erfolgen regelmäßig in der Zeit von 10 - 11.30 h. Die ersten 5 Tiere jeder Behandlungsgruppe werden 24 Stunden nach der ersten Behandlung getötet. Am 2., 6. und 12. Versuchstag werden je 5 geschorene, sonst aber unbehandelte Kontrolltiere getötet.

3.1.2 Histologische Technik

Die Mäuse werden mit Äther narkotisiert und durch Eröffnen der großen Halsgefäße getötet. Im Behandlungsgebiet wird die Rückenhaut von der Muskulatur präpariert. Die Hautprobe wird mit der feuchten Unterseite auf Karton gelegt und an den Rändern mit Heftklammern befestigt, um das Einrollen zu verhindern.

Fixation: 24 Stunden in Susa-Gemisch;

Einbettung: Paraffin;

Schnitttrichtung: Parallel zur Haarreihe, also quer zur Haarrichtung;

Schnittdicke: 5 μ m;

Färbung: Hämatoxylin-Eosin.

Vor der histometrischen Auswertung werden alle Hautschnitte einer allgemeinen histologischen Beurteilung unterzogen.

3.1.3 Messung der Epidermisfläche

Alle histometrischen Untersuchungen erfolgen an interfollikulärer Epidermis.

Aus jeder Haut werden 20 Epidermisfelder von $50\text{ }\mu\text{m}$ Länge (d.h. $1000\text{ }\mu\text{m}$ Epidermislänge pro Maus) nach Mikroprojektion gezeichnet (Mikroskop: Zeiss Standard, Typ GFL, Objektiv: Neofluar 100/1.30 Öl, Okular 8 x, Quecksilberhochdrucklampe, Zeiss-Projektionsspiegel). Das Epidermisfeld wird vom unteren Rand der Basalzellschicht (Basalmembran) und dem oberen Rand des Stratum granulosum begrenzt. Die seitliche Begrenzung erfolgt durch markierte Linien auf dem Zeichenpapier, deren Abstand $50\text{ }\mu\text{m}$ entspricht.

Die Fläche der gezeichneten Epidermisfelder wird durch zweimaliges Umfahren mit einem Planimeter gemessen. Die Summe von 20 vermessenen Epidermisfeldern pro Maus ergibt nach Umrechnung mit dem Vergrößerungsfaktor die Epidermisfläche in μm^2 .

Die durchschnittliche Epidermisdicke von der Basalmembran bis an das Stratum corneum wird aus dem Verhältnis planimetrierte Epidermisfläche zur ausgewerteten Epidermislänge ($1000\text{ }\mu\text{m}$) errechnet.

3.1.4 Kernzählung

Es ist allgemein üblich, für einkernige Zellen die Kernzahl als repräsentativ für die Zellzahl anzugeben. Nach HAUG (1967) entspricht die Kernzahl im Gewebe jedoch nur dann der Zellzahl, wenn durch einen Korrekturfaktor sowohl die Kerngröße als auch die Schnittdicke berücksichtigt werden. Da Kerngrößen in meiner Arbeit nicht gemessen wurden und der Korrekturfaktor deshalb nicht zu bestimmen ist, wird im folgenden der Begriff "Kernzählung" verwendet.

Der in einer Basalzelle liegende Kern wird als Basalkern bezeichnet. Entsprechendes gilt für die Kerne von Spinos- und Granulosazellen.

Es werden folgende Kerntypen nach Form und Lage in der Epidermis unterschieden:

- Basalkerne: Sie sind in der Nähe der Basalmembran zu finden. In der normalen Epidermis sind die Basalkerne überwiegend rund, in der hyperplastischen Epidermis zylindrisch und senkrecht zur Basalmembran eingestellt. Die Basalkerne sind chromatinreich. Das umgebende Zytoplasma ist basophil und schaumig, Zellgrenzen können nicht wahrgenommen werden.
- Spinosakerne: Zu ihnen werden vesikuläre Kerne gezählt, die transversal zur Basalmembran liegen. Ihre Zellen sind polygonal oder rundlich und haben homogenes, leicht acidophiles Zytoplasma und schwach angedeutete Zellgrenzen.
- Granulosakerne: Diese vesikulären und flachelliptischen Kerne liegen in meist spindelförmigen Zellen direkt unter dem Stratum corneum. Das Zytoplasma enthält kräftig eosin-gefärbte Keratohyalin granula. Kerne gleichen Aussehens, aber ohne Granula im umgebenden Zytoplasma werden als Spinosakerne gezählt.
- Degenerierte Kerne: In diese Gruppe fallen alle deutlich pyknotischen und karyolytischen Kerne. Hydropische Kerne mit einzelnen Vakuolen ohne Veränderungen an der Kernmembran werden nicht als degenerierte Kerne angesprochen, sondern nach ihrer Form und Lage dem entsprechenden Kerntyp zugezählt.

Die Zählung der genannten Kerntypen erfolgt in den Epidermisfeldern von 50 μ m Länge, nachdem diese zur Messung der Epidermisfläche (s. Abschnitt 3.1.3) markiert worden sind. Bei der Durchmusterung eines Epidermisfeldes in allen Tiefenbereichen wird jeder deutlich konturierte Kern nach Feststellung seines Kerntypes mit einem Symbol in die Zeichnung eingetragen.

Mitotische Kerne bleiben bei dieser Untersuchung unberücksichtigt. Sie werden in einem gesonderten Arbeitsgang ausgewertet (s. Abschnitt 3.1.5).

Die Kernzählungen werden an Hand der Zeichnungen durchgeführt. Die prozentualen Anteile der einzelnen Kerntypen an der Gesamtkernzahl werden errechnet und als Gruppenmittelwerte angegeben. Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Kerntypen und der Epidermisflächen wird festgestellt,

3.1.5 Zählung der mitotischen Kerne

Um eine möglichst große Zahl mitotischer Kerne zu erfassen, erfolgt die Zählung in 80 Epidermiskernen, d.h. auf einer Epidermislänge von 4000 μ m pro Maus. Es werden nur eindeutige Teilungsfiguren von der späten Prophase bis zur frühen Telo- phase gezählt. Damit wird vermieden, daß degenerierte Kerne mit in diese Zählung einbezogen werden.

Die Zählung der Mitosen wird an interfollikulärer Epidermis unter Ausschluß der Haarfollikelmündungen und ihrer näheren Umgebung durchgeführt.

Die Anzahl der Mitosen pro 4000 μ m Epidermislänge wird auf die Gesamtkernzahl pro 1000 μ m Epidermislänge bezogen. Der Anteil der Mitosen an der Gesamtkernzahl in Prozent wird errechnet.

3.1.6 Statistische Beurteilung der Untersuchungsergebnisse

Die statistische Beurteilung für Kernzahlen und Epidermisflächen erfolgt mit der dreifachen Varianzanalyse (WEBER, 1964). Außer den beiden Kondensatdosen A und B werden auch die Ergebnisse für verschiedene Tage der Behandlung und für je fünf Mäuse des gleichen Behandlungstages verglichen. Die

Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) ist deshalb nach 3 Faktoren (Dosen des ZRK, Tage, Tiere) und den zugehörigen Wechselwirkungen (Dosen x Tage, Dosen x Tiere, Tiere x Tage) aufzugliedern.

Um festzustellen, zwischen welchen Behandlungstagen statistisch gesicherte Unterschiede bestehen, wird das Testverfahren von Tukey (T-Methode) durchgeführt (LINDER, 1960).

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Histologische Befunde an der Mäusehaut von Kontrolltieren und mit Zigarettenrauchkondensat behandelten Tieren

Die allgemeine histologische Beurteilung der Haut erstreckt sich auf die Epidermis und das Korium, schließt den Hautmuskel aber nicht mit ein.

Die wichtigsten histologischen Befunde werden in Tabelle 2, Seite 16, für alle Gruppen zusammengefaßt wiedergegeben.

Kontrolltiere:

Die Epidermis besteht aus 1 - 2 Zellagen. Sie wird von einer gleichmäßig dicken Hornschicht bedeckt.

In der Epidermis überwiegen die Basalzellen, nur wenige Spinosazellen sind festzustellen. Granulosazellen und Zellgrenzen werden nicht beobachtet.

Verletzungen der Epidermis durch die Schur der Rückenhaare sind nicht zu erkennen.

Das Korium wird von einem dichten Netzwerk aus Bindegewebsfasern gebildet. Die Gefäße sind nur geringgradig mit Blut gefüllt. Bei den am 2. Versuchstag getöteten Kontrolltieren sind im Korium nur wenige Haarfollikel, die regelmäßig Haare enthalten, ausgebildet. Die Haarfollikel sind quergeschnitten und zeigen den für die jeweilige Schnittebene typischen Aufbau. Am 6. und 12. Versuchstag sind alle Häute in der aktiven Phase des Haarzyklus. Die den Haarfollikeln benachbarten großen Talgdrüsen sind prall mit gelblich schimmernden ungefärbten Körnchen gefüllt.

Tabelle 2: Beurteilung der histologischen Befunde an Epidermis und Korium bei den Mäusen der Gruppen A und B und bei den Kontrolltieren

Versuchs- tag	Veränderungen an der Epidermis				Veränderungen am Korium		
	Anzahl der Zellagen Gruppe A B	Nekrosen Gruppe A B	Inter- zelluläres Ödem Gruppe A B	Proliferation der Haarfollikel Gruppe A B	Hyperämie und Ödem Gruppe A B	Zellige Infiltration Gruppe A B	Verhalten der Talgdrüsen Gruppe A B
2	2 2-3	+	-	-	++	++	klein groß
3	2-3 3	++	++	-	++	++	fehlen klein
4	3-4 4	++	++	-	++	++	" "
5	6 3-4	-	++	++	+	+	" "
6	5 3	-	+	++	-	-	klein groß
7	4 2-3	-	-	+	-	-	" "
9	2-3 2	-	-	-	-	-	" "
11	2 1-2	-	-	-	-	-	groß groß
14	2 1-2	-	-	-	-	-	" "
Kon- troll- tiere	1-2	-	-	-	-	-	groß

Zeichenerklärung: - Normalbefund/keine pathologischen Veränderungen
 + geringgradige Abweichung vom Normalbefund
 ++ hochgradige Abweichung vom Normalbefund

Behandelte Tiere:

Gruppe A: Im Verlauf der Behandlung nimmt die Epidermis stetig an Dicke zu. Zwei Tage nach der 3. Behandlung, am 5. Versuchstag, hat sie mit sechs Zellagen die größte Dicke erreicht. Danach erfolgt eine langsame Abnahme der Epidermisdicke. Am letzten Versuchstag besteht die Epidermis aus zwei Zellagen. Auf Grund des histologischen Bildes unterscheidet sie sich nicht mehr sicher von der Epidermis der Kontrolltiere. Gleichlaufend mit der Epidermisdicke wächst auch die Dicke der Hornschicht. Am 4. Versuchstag enthält das Stratum corneum deformierte und pyknotische Zellkerne (Parakeratose). Die folgende starke Abschuppung führt zur Rückbildung des Stratum corneum. Am 14. Versuchstag gleicht die Dicke der Hornschicht bei den behandelten Tieren der bei den Kontrollen.

Während der Behandlung entstehen nekrotische Epidermisbezirke. Die Nekrosen reichen am 2. Versuchstag bis in das Stratum basale und nehmen an den folgenden zwei Tagen an Ausdehnung weiter zu. Die Epidermis und das Korium sind auf weite Strecken eingeschmolzen. In der Umgebung der Nekroseherde liegen dichte Infiltrate aus Granulozyten und Lymphozyten. Die Hautoberfläche ist von schwarz-blauem Detritus aus Zelltrümmern und Entzündungszellen bedeckt, darüber sind Reste der alten Hornschicht festzustellen. Nach dem 4. Versuchstag heilen die Epidermisdefekte durch Regeneration von den Wundrändern her ab. Später findet sich nur noch vereinzelt Detritus auf einer neugebildeten Epidermis.

Gleichzeitig mit den nekrotischen Veränderungen an der Epidermis werden Ödematisierung und Auflockerung der Epidermisstrukturen beobachtet. Am 4. Versuchstag sind deutliche Zellgrenzen und Interzellularbrücken im Stratum spinosum ausgebildet. Einen Tag später werden auch die Basalzellen durch das interzelluläre Ödem auseinandergedrängt. Die Zellen selbst zeigen hochgradige Vakuolisierung und hydropische

Degeneration (intrazelluläres Ödem, Spongiose). Nach dem 6. Versuchstag sind diese Erscheinungen nicht mehr festzustellen.

Auch an der Zellpopulation, aus der die Epidermis aufgebaut ist, lassen sich tiefgreifende Veränderungen in Zahl und Zusammensetzung erkennen.

Diese Veränderungen werden durch die Kernzählungen erfaßt. Sie sollen deshalb nicht an dieser Stelle, sondern bei der Besprechung der histometrischen Untersuchungen (Abschnitt 3.2.3) dargestellt werden.

Im Korium sind an den ersten drei Versuchstagen deutliche Entzündungszeichen zu beobachten. Die Bindegewebsfasern sind verdickt, auseinandergedrängt und stellenweise zerrissen. Die Gefäße sind prall mit Blut gefüllt, selbst kleinste Kapillaren treten hervor.

Dichte Ansammlungen von Granulozyten und Lymphozyten finden sich hauptsächlich unter den nekrotischen Epidermisbezirken. Nach dem 4. Versuchstag klingen die entzündlichen Veränderungen am Korium schnell ab.

Am 3. Versuchstag lassen sich degenerative Veränderungen an den Haarfollikeln feststellen (Vakuolisierung und Pyknose der Epithelkerne). Später werden die Haarfollikel in solide Zellstränge umgewandelt, die nur Hornmassen, aber keine typischen Haare enthalten. Der Höhepunkt dieser Follikelproliferation wird am 6. Versuchstag erreicht. Es entstehen dichte Gruppen von miteinander verschmolzenen Follikeln. Ein Präparat zeigt auch am 9. Versuchstag noch eine sehr starke Follikelproliferation, so daß die histometrische Auswertung nicht möglich ist.

An den folgenden Tagen ist eine Aktivierung des Haarwachstums festzustellen. Im Korium liegen die Haarfollikel dicht nebeneinander und enthalten regelrecht gebildete Haare. Elf Tage nach der 3. Behandlung sind alle Häute in der aktiven Phase des Haarzyklus.

Die Talgdrüsen degenerieren schon nach der ersten Behandlung. Vom 3. Versuchstag an sind sie völlig zurückgebildet. Drei Tage nach der dritten Behandlung sind wieder kleine Talgdrüsen zu beobachten. Sie nehmen stetig an Größe zu und entsprechen am 11. Versuchstag der Talgdrüsengröße der Kontrolltiere.

Gruppe B: Die Dickenzunahme der Epidermis erreicht mit 4 Zellschichten am 4. Versuchstag das Maximum. Am 11. Versuchstag entspricht die Dicke der Epidermis mit 1 - 2 Zellschichten dem Befund bei den Kontrollen. Die Hornschicht schuppt sich nach der zweiten Behandlung stark ab. Parakeratose wird nicht beobachtet. Epidermisnekrosen sind selten festzustellen. Die Nekrosen sind auf kleine umschriebene Stellen begrenzt und erstrecken sich nicht in das Korium. Schon am 4. Versuchstag sind die Defekte nur noch an dem auf der Hautoberfläche liegenden Detritus zu erkennen.

Ein geringgradiges interzelluläres Ödem ist am 3. und 4. Versuchstag ausgebildet.

Im Korium sind Zeichen für entzündliche Veränderungen wie Hyperämie, Ödematisierung und zellige Infiltration nur schwach ausgeprägt (3. Versuchstag).

Die Haarfollikel proliferieren nicht. Schon am 7. Versuchstag sind alle Häute in der aktiven Phase des Haarzyklus.

Die Talgdrüsen sind zwischen dem 3. und 5. Versuchstag klein, zeigen aber keine degenerativen Veränderungen an den Zellkernen. Vom 6. Versuchstag an sind wieder große, prall mit gelblichen Körnchen gefüllte Drüsen festzustellen.

Zusammenfassung der histologischen Befunde:

Dreimalige Behandlung in der Gruppe A (50 mg ZRK) führt zu einer tiefgreifenden Schädigung der Haut. An der Epidermis werden großflächige Nekrosen, ausgeprägtes interzelluläres und intrazelluläres Ödem sowie eine deutliche Dickenzunahme der Epidermis beobachtet.

Im Korium zeigen sich Hyperämie, Ödematisierung und zellige Infiltration mit Granulozyten und Lymphozyten. Proliferation der Haarfollikel und völliger Schwund der Talgdrüsen werden nur in dieser Behandlungsgruppe festgestellt.

Dagegen ist die Reaktion der Haut auf die Behandlung mit 25 mg ZRK (Gruppe B) geringer. Die Epidermis zeigt nur eine mäßige Dickenzunahme, die schnell wieder zurückgeht.

Im Korium sind alle Entzündungszeichen nach der dritten Behandlung abgeklungen. Frühzeitig setzt das Haarwachstum ein. Die Talgdrüsen degenerieren während der Versuchsdauer nicht vollständig.

Die Kontrolltiere lassen keinen Einfluß der Schur des Rückenhaares auf Epidermis und Korium erkennen.

3.2.2 Ergebnisse der histometrischen Untersuchung der Epidermis bei unbehandelten Mäusen

Die Ergebnisse der histometrischen Analyse der Epidermis bei den Kontrolltieren sind in der Tabelle 3 und in den Abbildungen 1 und 2 wiedergegeben.

Tabelle 3: Ergebnisse der histometrischen Untersuchung
an der Epidermis der Kontrolltiere
- Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -

Anzahl der untersuchten Tiere	15
Epidermisdicke (μm)	10.6 (10.0 - 11.3)
Epidermisfläche (μm^2) pro 1000 μm Epidermislänge	10 573 (9978 - 11 317)
Volumenwert der Zellen (μm^3)	384 (332 - 433)
Gesamtzahl der Kerne pro 1000 μm Epidermislänge	201 (181 - 232)
Kerndifferenzierung	
Kerntyp	Absolute Kernzahl Relative Kernzahl (%)
Basalkerne	144 71.5
Spinosakerne	51 25.3
Granulosakerne	0 0.0
Degenerierte Kerne	6 2.9
Mitotische Kerne *)	2 0.3

*) Die mitotischen Kerne wurden in 4000 μm Epidermislänge gezählt

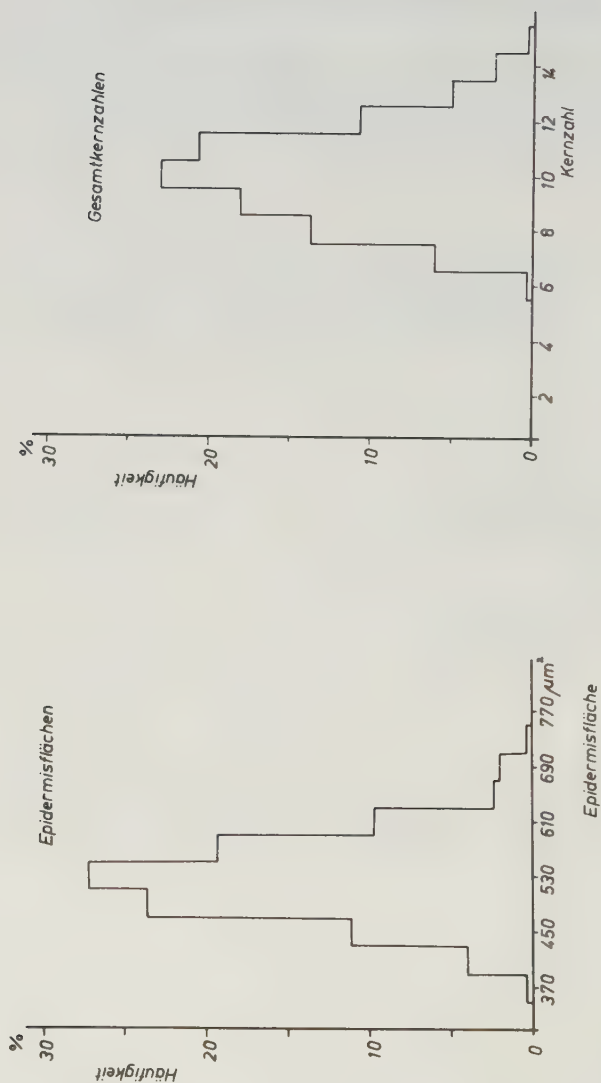


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung der Epidermisflächen und der Gesamtkernzahlen pro 50 μm Epidermislänge bei den Kontrolltieren, $N = 300$

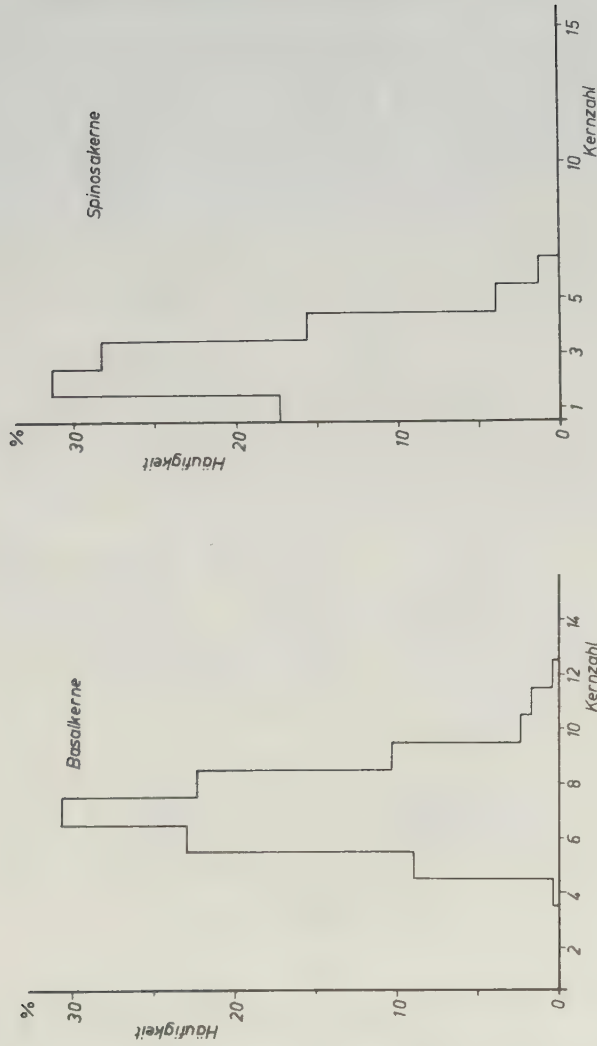


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung der Basal- und Spinosakerne pro 50 μ m Epidermislänge bei den Kontrolltieren, N = 300

Bei einer durchschnittlichen Epidermisdicke von $10.6\text{ }\mu\text{m}$ weichen die Extremwerte weniger als 10 % vom Mittelwert der Gruppe ab. Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Epidermisflächen ($N = 20$ Werte pro Tier und 300 für die Gruppe) und damit auch der Epidermisdicke wird in Abbildung 1, Seite 22, dargestellt. Bei einer Klassenbreite von $40\text{ }\mu\text{m}^2$ liegt das Maximum der Verteilung in der Klasse von 510 bis $550\text{ }\mu\text{m}^2$. Damit entfallen 27.6 % aller Werte auf den Gipfel der Verteilung. Das ist für eine Beurteilung als Normalverteilung ausreichend. Auf $1000\text{ }\mu\text{m}$ Epidermislänge werden bei den Kontrolltieren im Durchschnitt 201 Kerne gezählt. Die Variationsbreite liegt mit 181 - 232 Kernen bei -10 und +16 Prozent.

Die Gesamtzahl der Kerne besteht aus 71.5 % Basal-, 25.3 % Spinosakernen, 2.9 % degenerierten und 0.3 % mitotischen Kernen. Granulosakerne werden nicht beobachtet. Die Häufigkeitsverteilung der Gesamtzahl der Kerne und der Basal- und Spinosakerne entspricht dem Typ der Normalverteilung (Abbildung 1 und 2, Seite 22 und 23).

Die Häufigkeitsverteilung der Epidermisflächen und Kernzahlen wurde auch bei den behandelten Mäusen für jeden Versuchstag festgestellt. Da die Werte immer normal verteilt waren, wird auf ihre graphische Darstellung in den folgenden Abschnitten verzichtet.

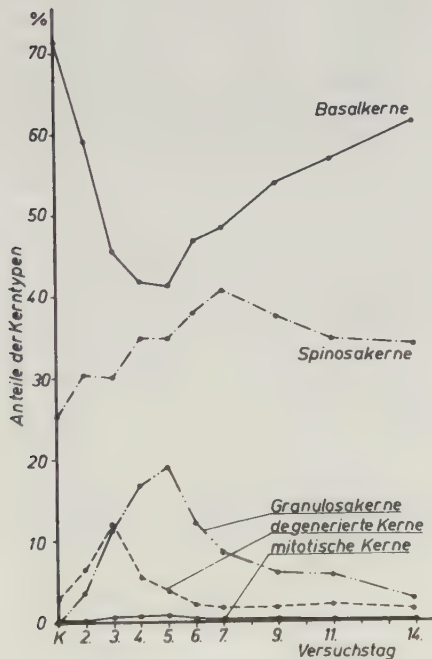
Um den Zusammenhang zwischen der Größe der Epidermisfläche und der darin enthaltenen Kernzahl ("Kerndichte") durch einen charakteristischen Wert ausdrücken zu können, wird folgende von MERENMIES (1959) angegebene Formel benutzt:

$$V = \left[\frac{F}{Z} \right] \frac{3}{2}$$

Dabei ist V das durchschnittliche Volumen der Zellen (in μm^3), F die ausgewertete Epidermisfläche in μm^2 und Z die Anzahl der in dieser Epidermisfläche enthaltenen Kerne. Die an verschiedenen Versuchstagen vorkommende Ödematisierung der Epidermisstrukturen geht mit in den Volumenwert ein. Für die Epidermis der unbehandelten Kontrolltiere ergibt sich der durchschnittliche Volumenwert der Zellen mit $384\text{ }\mu\text{m}^3$.

3.2.3 Ergebnisse der histometrischen Untersuchung der Epidermis bei den Mäusen der Gruppen A und B

Gruppe A: Die Gruppenmittelwerte für die Epidermisdicke, die durchschnittlichen Volumenwerte der Zellen und die Kernzahlen in der Epidermis sind aus den Tabellen 4 und 5, Seite 26 und 27, zu entnehmen. Ihre graphische Darstellung erfolgt in Abbildung 3, 4 und 5.



K = Werte der Kontrolltiere

Abbildung 3: Prozentuale Anteile der Kerntypen (bezogen auf die Gesamtkernzahl) in der Epidermis der Mäuse aus Gruppe A
- Gruppenmittelwerte -

Tabelle 4: Epidermisfläche, Epidermisdicke und Volumenwert der Zellen bei den Mäusen der Gruppe A - Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -

Ver- suchs- tag	Anzahl der Behand- lungen	Anzahl der untersuchten Tiere	Epidermis- fläche in μm^2	Epidermisdicke in μm	Volumenwert der Zellen in μm^3
2	I	5	17 389	17.4 (15.8 - 18.7)	835 (686 - 1003)
3	II	5	21 888	21.9 (19.8 - 24.9)	1063 (767 - 1347)
4	III	5	28 413	28.4 (26.9 - 30.4)	1204 (1125 - 1319)
5	III	5	31 645	31.6 (31.0 - 32.7)	926 (721 - 1074)
6	III	5	26 497	26.5 (23.8 - 29.7)	791 (670 - 965)
7	III	5	23 069	23.1 (22.0 - 24.5)	579 (504 - 662)
9	III	4	18 727	18.7 (16.5 - 19.8)	562 (459 - 654)
11	III	5	19 118	19.1 (18.1 - 21.1)	579 (478 - 661)
14	III	5	14 290	14.3 (13.1 - 17.1)	403 (316 - 565)
Kontrolle	keine	15	10 573	10.6 (10.0 - 11.3)	384 (332 - 433)

Tabelle 5: Ergebnisse der Kernzählung in der Epidermis der Mäuse aus Gruppe A - Gruppenmittelwerte -

Ver- suchs- tag	Anzahl der Behand- lungen	Anzahl der unter- suchten Tiere	Gesamtanzahl der Kerne in 1000 µm Epidermis- länge	K e r n d i f f e r e n z i e r u n g								Mitotische Kerne absolut	Mitotische Kerne absolut %
				Basalkerne		Spinosakerne		Granulosa- kerne		Degenerierte Kerne			
				absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%		
2	I	5	196(177-205)	116	59.1	60	30.5	7	3.7	13	6.5	2	0.2
3	II	5	210(183-236)	96	45.7	64	30.1	24	11.4	26	12.1	6	0.7
4	III	5	251(243-258)	106	41.8	88	35.0	43	16.8	14	5.6	8	0.8
5	III	5	333(306-390)	139	41.3	117	34.9	64	19.1	13	3.9	11	0.8
6	III	5	310(298-331)	146	47.0	119	38.3	38	12.1	7	2.2	5	0.4
7	III	5	332(316-355)	162	48.6	135	40.8	29	8.6	6	1.7	4	0.3
9	III	4	275(263-285)	149	54.2	104	37.6	17	6.0	5	1.8	4	0.4
11	III	5	275(247-296)	157	57.1	96	34.9	16	5.7	6	2.1	2	0.2
14	III	5	262(250-282)	161	61.6	90	34.1	7	2.7	4	1.4	2	0.2
Kon- trolle	keine	15	201(181-232)	144	71.5	51	25.3	0	0.0	6	2.9	2	0.3

*) Die mitotischen Kerne wurden in 4000 µm Epidermislänge gezählt

Am 2. Versuchstag beträgt die mittlere Epidermisdicke 17.4 μm . Der durchschnittliche Volumenwert der Zellen liegt mit $835 \mu\text{m}^3$ um 120 % über dem Wert für die Kontrollen. Die Gesamtzahl der Kerne beläuft sich auf 196.

Die Zahl der Basalkerne ist nach der ersten Behandlung um 18 % zurückgegangen, während die Zahl der Spinosakerne im Vergleich zur Kontrolle um 20 % angestiegen ist. Erstmals werden Granulosakerne in der behandelten Epidermis festgestellt (3.7 %).

Am 3. Versuchstag ist die Epidermis mit 21.9 μm doppelt so dick wie bei den unbehandelten Mäusen. Der durchschnittliche Volumenwert beträgt $1\,063 \mu\text{m}^3$. Die Gesamtkernzahl ist im Vergleich zur Kontrolle konstant geblieben. Dagegen ist der Anteil der Basalkerne an der Gesamtkernzahl weiter zurückgegangen, ohne daß die Spinosakernzahl prozentual zugenommen hat.

Mit 0.7 % liegt der Anteil der mitotischen Kerne deutlich über dem Wert für die Kontrolltiere.

Am 4. Versuchstag ist die Epidermisdicke weiter angewachsen. Auch der Volumenwert der Zellen hat gegenüber dem Vortag zugenommen.

Die einzelnen Kerntypen verteilen sich wie folgt auf die Gesamtkernzahl von 251: Basalkerne 41.8 %, Spinosakerne 35.0 %, Granulosakerne 16.8 %, degenerierte 5.6 % und mitotische Kerne 0.8 %. Der Anteil der Granulosakerne und der mitotischen Kerne ist damit weiter angestiegen.

Am 5. Versuchstag erreicht die Epidermisdicke den höchsten Wert in diesem Versuch (31.6 μm). Die Epidermis ist an diesem Tag etwa dreimal so dick wie bei den Kontrolltieren. Der mittlere Volumenwert ist mit $926 \mu\text{m}^3$ wieder kleiner als am 4. Versuchstag. Die Gesamtkernzahl beträgt 333 und zeigt ebenfalls ein deutliches Maximum.

Die prozentualen Anteile der Zelltypen haben sich im Vergleich zum Vortag nur unwesentlich verändert. 0.8 % aller Kerne der Epidermis befinden sich im Stadium der Mitose.

Am 6. Versuchstag ist die Dicke der Epidermis, die Gesamtzahl der Kerne und der Volumenwert zurückgegangen.

Folgende Anteile entfallen auf die verschiedenen Kerntypen: Basalkerne 47.0 %, Spinosakerne 38.3 %, Granulosakerne 12.1 %, degenerierte 2.2 % und mitotische Kerne 0.4 %.

Auffällig ist der deutliche Rückgang der Mitosenzahl im Vergleich zum Vortag.

Am 7. Versuchstag beträgt die Epidermisdicke noch 23.1 (22.0 - 24.5) μm .

Während der Anteil der Spinosakerne mit 40.8 % den höchsten Wert erreicht hat, entspricht der Anteil der mitotischen Kerne dem Wert für die unbehandelte Mäuseepidermis.

Am 9. Versuchstag beträgt die Epidermisdicke 18.7 μm und der Volumenwert der Zellen 562 μm^3 .

Die Differenzierung der Gesamtzahl der Kerne ergibt: 54.2 % Basal-, 37.6 % Spinos- und 6.0 % Granulosakerne, sowie 1.8 % degenerierte und 0.4 % mitotische Kerne.

Am 11. Versuchstag sind Veränderungen noch an den prozentualen Anteilen der einzelnen Kerntypen, aber nicht an der absoluten Zahl der Kerne festzustellen.

In dem Maße, wie der Anteil der Basalkerne (57.1 %) zunimmt, geht der der Spinosakerne (34.9 %) zurück. Auch bei den Granulosakernen und der Mitosenzahl ist ein leichter Rückgang zu beobachten.

Am 14. Versuchstag ist die Epidermis mit 14.3 (13.1 - 17.1) μ m noch deutlich dicker als die Epidermis der unbehandelten Mäuse. Der durchschnittliche Volumenwert der Zellen liegt mit $403 \mu\text{m}^3$ um 5 % über dem Kontrollwert.

Die Gesamtkernzahl von 262 besteht aus 61.6 % Basal-, 34.1 % Spino- und 2.7 % Granulosakernen sowie aus 1.4 % degenerierten und 0.2 % mitotischen Kernen. Am letzten Versuchstag entsprechen nur die prozentualen Anteile der degenerierten und mitotischen Kerne weitgehend den entsprechenden Werten der Kontrolltiere.

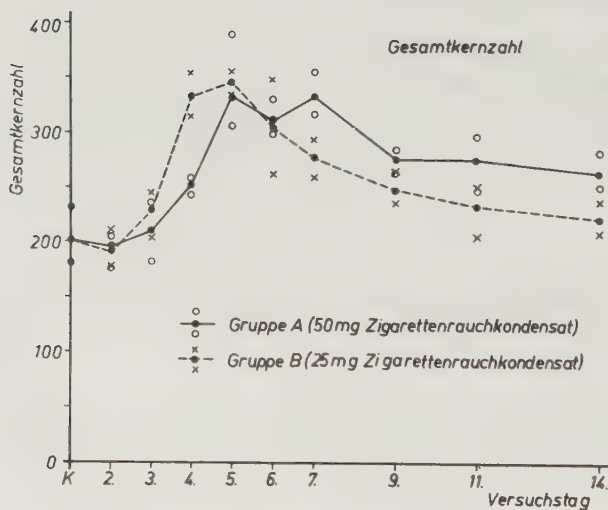
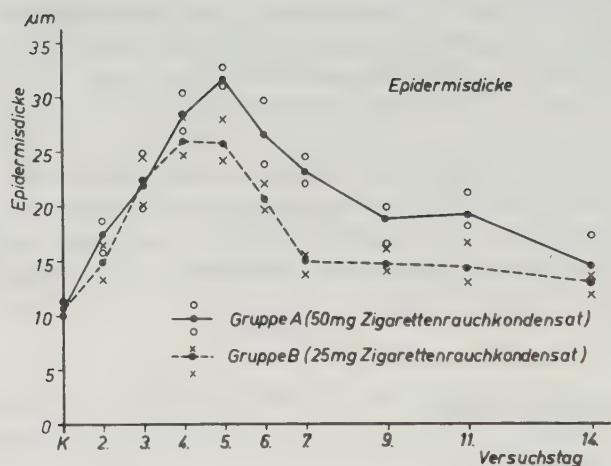
Zusammenfassung der histometrischen Untersuchungsergebnisse für Gruppe A (50 mg ZRK):

Die Ergebnisse der histometrischen Untersuchung lassen folgendes erkennen:

- Die Epidermisdicke wächst bis zum 5. Versuchstag. Die Epidermis ist an diesem Tag dreimal so dick wie die der Kontrolltiere. In der Folgezeit nimmt die Epidermisdicke zwar ab, liegt am Versuchsende aber noch um 35 % über der Epidermisdicke der unbehandelten Mäuse.

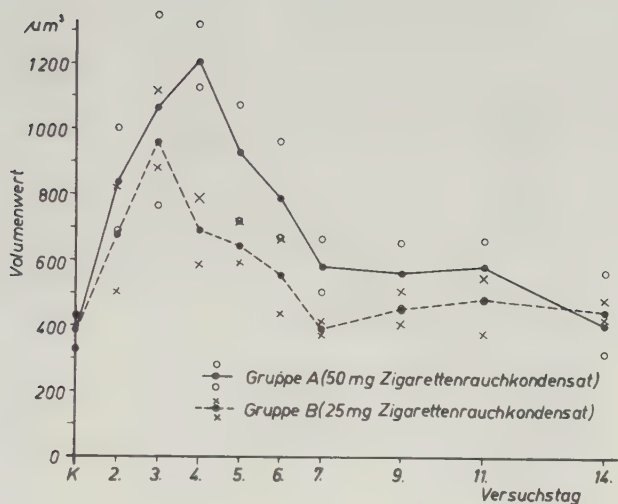
Die durchschnittlichen Volumenwerte der Zellen steigen während der Behandlung stark an. Das Maximum erreichen sie schon am 4. Versuchstag. Nach einem raschen Abfall bleiben die Volumenwerte zwischen dem 7. und 11. Versuchstag annähernd konstant. Am letzten Tag des Versuchs entsprechen die Volumenwerte weitgehend den Werten der Kontrolltiere.

- Die Gesamtzahl der Kerne ändert sich im Vergleich zur Kontrolle am 2. und 3. Versuchstag nicht. Zwischen dem 5. und 7. Versuchstag erreicht sie ihren höchsten Wert. Am 14. Versuchstag ist die Gesamtzahl der Kerne noch deutlich größer als bei den unbehandelten Mäusen.
- Die Zahl der Basalkerne vermindert sich während der Behandlung deutlich. Am 5. Versuchstag werden prozentual die wenigsten Basalkerne festgestellt. An den folgenden Tagen nimmt der Anteil der Basalkerne ständig zu, entspricht aber am letzten Versuchstag noch nicht dem Wert der Kontrollen.
- Die Spinosakernzahl wächst im Verlauf der Behandlung an und erreicht am 7. Versuchstag das Maximum. Obwohl die Kernzahl dann abnimmt, entspricht sie am letzten Versuchstag nicht den Kontrollwerten.
- Granulosakerne werden erstmalig am 2. Versuchstag (einen Tag nach der ersten Behandlung) festgestellt. Ihre größte Anzahl erreichen sie am 5. Versuchstag. Danach vermindert sich die Zahl der Granulosakerne rapid. Am letzten Versuchstag sind sie noch in geringer Zahl zu beobachten.
- Degenerierte Kerne sind nur in den ersten Versuchstagen in größerer Zahl vorhanden. Vom 6. Versuchstag an liegt ihre Zahl geringgradig unter dem für die unbehandelte Mäuseepidermis ermittelten Wert.
- Mitotische Kerne kommen zwischen dem 3. und 5. Versuchstag häufig vor, an den folgenden Versuchstagen entspricht ihre Zahl der Mitosenzahl der Kontrolltiere.



K = Werte der Kontrolltiere

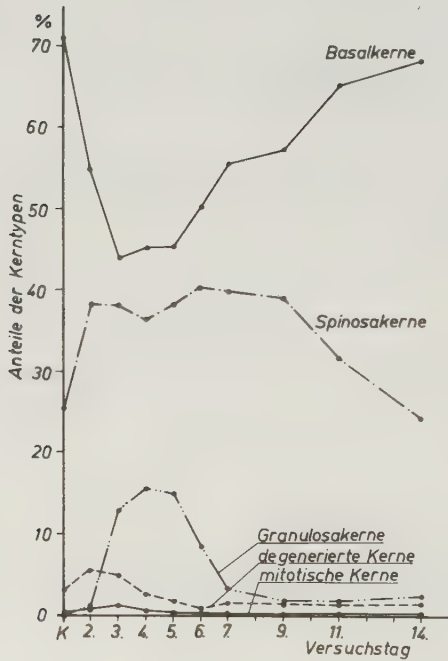
Abbildung 4: Vergleichende Darstellung der Epidermisdicke und der Gesamtkernzahl in 1000 µm Epidermislänge für die Gruppen A und B
 - Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -



K = Werte der Kontrolltiere

Abbildung 5: Vergleichende Darstellung der Volumenwerte der Zellen für die Gruppen A und B
- Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -

Gruppe B: Die Ergebnisse der histometrischen Analyse der Epidermis sind in Tabelle 6 und 7 auf Seite 35 und 36 sowie in Abbildung 4, 5 und 6, Seite 32, 33, 34, enthalten.



K = Werte der Kontrolltiere

Abbildung 6: Prozentuale Anteile der Kerntypen (bezogen auf die Gesamtkernzahl) in der Epidermis der Mäuse aus Gruppe B
- Gruppenmittelwerte -

Tabelle 6: Epidermisfläche, Epidermisdicke und Volumenwert der Zellen bei den Mäusen der Gruppe B - Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -

Ver- suchs- tag	Anzahl der Behand- lungen	Anzahl der untersuchten Tiere	Epidermis- fläche in μm^2	Epidermisdicke in μm	Volumenwert der Zellen in μm^3
2	I	5	14 302	14.8 (13.3 - 16.5)	677 (500 - 821)
3	II	5	22 156	22.2 (20.0 - 24.4)	958 (875 - 1111)
4	III	5	25 878	25.9 (24.6 - 28.1)	689 (583 - 791)
5	III	5	25 706	25.7 (24.1 - 27.9)	643 (589 - 716)
6	III	5	20 580	20.6 (19.6 - 22.0)	557 (435 - 665)
7	III	5	14 764	14.8 (13.6 - 15.4)	389 (370 - 411)
9	III	5	14 609	14.6 (13.9 - 15.9)	452 (401 - 505)
11	III	5	14 273	14.3 (12.9 - 16.5)	480 (373 - 542)
14	III	5	12 905	12.9 (11.7 - 13.4)	443 (424 - 476)
Kontrolle	keine	15	10 573	10.6 (10.0 - 11.3)	384 (332 - 433)

Tabelle 7: Ergebnisse der Kernzählung in der Epidermis der Mäuse aus Gruppe B - Gruppenmittelwerte -

Ver- suchs- tag	Anzahl der Behan- dungen	Anzahl der unter- suchten Tiere	Gesamtanzahl der Kerne in 1000 μ m Epidermis- länge	K e r n d i f f e r e n z i e r u n g							
				Basalkerne absolut %	Spinosakerne absolut %	Granulosa- kerne absolut %	Degenerierte Kerne absolut %	Mitotische Kerne absolut %			
2	I	5	191(179-211)	105 54.3	73 38.2	2 1.0	11 5.6	7 0.9			
3	II	5	228(204-245)	101 43.8	88 38.0	28 12.0	11 4.9	12 1.3			
4	III	5	332(311-354)	151 45.1	121 36.3	51 15.5	9 2.6	7 0.5			
5	III	5	345(334-355)	156 45.2	132 38.0	51 14.8	6 1.7	3 0.3			
6	III	5	304(262-348)	153 50.2	123 40.3	26 8.5	2 0.8	3 0.2			
7	III	5	277(259-293)	153 55.4	111 39.7	9 3.2	4 1.5	2 0.2			
9	III	5	248(235-264)	142 57.3	97 38.9	5 1.9	4 1.6	3 0.3			
11	III	5	233(205-250)	153 65.1	73 31.4	4 1.9	3 1.3	3 0.3			
14	III	5	222(208-236)	152 68.2	62 27.6	5 2.4	3 1.5	3 0.3			
Kon- trolle	keine	15	201(181-232)	144 71.5	51 25.3	0 0.0	6 2.9	2 0.3			

*) Die mitotischen Kerne wurden in 4000 μ m Epidermislänge gezählt

Tabelle 6: Epidermisfläche, Epidermisdicke und Volumenwert der Zellen bei den Mäusen der Gruppe B - Gruppenmittelwerte und Variationsbreite der Werte -

Ver- suchs- tag	Anzahl der Behand- lungen	Anzahl der untersuchten Tiere	Epidermis- fläche in μm^2	Epidermisdicke in μm	Volumenwert der Zellen in μm^3
2	I	5	14 302	14.8 (13.3 - 16.5)	677 (500 - 821)
3	II	5	22 156	22.2 (20.0 - 24.4)	958 (875 - 1111)
4	III	5	25 878	25.9 (24.6 - 28.1)	689 (583 - 791)
5	III	5	25 706	25.7 (24.1 - 27.9)	643 (589 - 716)
6	III	5	20 580	20.6 (19.6 - 22.0)	557 (435 - 665)
7	III	5	14 764	14.8 (13.6 - 15.4)	389 (370 - 411)
9	III	5	14 609	14.6 (13.9 - 15.9)	452 (401 - 505)
11	III	5	14 273	14.3 (12.9 - 16.5)	480 (373 - 542)
14	III	5	12 905	12.9 (11.7 - 13.4)	443 (424 - 476)
Kontrolle	keine	15	10 573	10.6 (10.0 - 11.3)	384 (332 - 433)

Tabelle 7: Ergebnisse der Kernzählung in der Epidermis der Mäuse aus Gruppe B - Gruppenmittelwerte -

Ver- suchs- tag	Anzahl der Behand- lungen	Anzahl der unter- suchten Tiere	Gesamtanzahl der Kerne in 1000 µm Epidermis- länge	K e r n d i f f e r e n z i e r u n g								Mitotische Kerne absolut %
				Basalkerne absolut %	Spinosakerne absolut %	Granulosa- kerne absolut %	Degenerierte Kerne absolut %					
2	I	5	191(179-211)	105 54.3	73 38.2	2 1.0	11 5.6	7 0.9				
3	II	5	228(204-245)	101 43.8	88 38.0	28 12.0	11 4.9	12 1.3				
4	III	5	332(311-354)	151 45.1	121 36.3	51 15.5	9 2.6	7 0.5				
5	III	5	345(334-355)	156 45.2	132 38.0	51 14.8	6 1.7	3 0.3				
6	III	5	304(262-348)	153 50.2	123 40.3	26 8.5	2 0.8	3 0.2				
7	III	5	277(259-293)	153 55.4	111 39.7	9 3.2	4 1.5	2 0.2				
9	III	5	248(235-264)	142 57.3	97 38.9	5 1.9	4 1.6	3 0.3				
11	III	5	233(205-250)	153 65.1	73 31.4	4 1.9	3 1.3	3 0.3				
14	III	5	222(208-236)	152 68.2	62 27.6	5 2.4	3 1.5	3 0.3				
Kon- trolle	keine	15	201(181-232)	144 71.5	51 25.3	0 0.0	6 2.9	2 0.3				

*) Die mitotischen Kerne wurden in 4000 µm Epidermislänge gezählt

Am 2. Versuchstag beträgt die Epidermisdicke 14.8 (13.3 - 16.5) μm . Der durchschnittliche Volumenwert der Zellen liegt mit 677 μm^3 um 76 % über dem Wert für die Kontrollen.

Von 191 insgesamt gezählten Kernen sind 54.3 % Basal-, 38.2 % Spinos- und 1.0 % Granulosakerne. 5.6 % aller Kerne zeigen degenerative Veränderungen. Die Zahl der mitotischen Kerne übersteigt mit 0.9 % die Werte für die Kontrolltiere und die Mäuse der Gruppe A.

Am 3. Versuchstag ist die Epidermis 22.2 μm dick. Der durchschnittliche Volumenwert der Zellen beträgt 958 μm^3 . Die Gesamtkernzahl ist geringgradig angestiegen, liegt aber in der Variationsbreite der Werte für die Kontrollen.

Auf die Kernzahl von 228 entfallen: 43.8 % Basalkerne, 38.0 % Spinosakerne, 12.0 % Granulosakerne, 4.9 degenerierte Kerne und 1.3 % mitotische Kerne.

Die Anzahl der mitotischen Kerne erreicht damit den höchsten Wert im Versuch. Die Zahl der degenerierten Kerne ist schon nach der zweiten Behandlung zurückgegangen.

Am 4. Versuchstag ist die Epidermisdicke weiter angewachsen. Der Volumenwert hat gegenüber dem Vortag abgenommen. Die Gesamtkernzahl (332) liegt deutlich über der Kernzahl des gleichen Versuchstages in Gruppe A. Die Granulosakerne haben mit 15.5 % ihr Maximum erreicht. Die Zahl der mitotischen Kerne ist merklich zurückgegangen (0.5 %).

Am 5. Versuchstag beträgt die Epidermisdicke 25.7 (24.1 - 27.9) μm . Die Gesamtzahl der Kerne hat weiter zugenommen (345). Folgende Anteile entfallen auf die verschiedenen Kerntypen: 45.2 % Basalkerne, 38.0 % Spinosakerne, 14.8 % Granulosakerne, 1.7 % degenerierte Kerne und 0.3 % mitotische Kerne.

Am 6. Versuchstag hat die Epidermisdicke im Vergleich zum Vortag abgenommen. Der Volumenwert beträgt 557 μm^3 .

Die Anteile der Basal- und Spinosakerne machen mit 50.2 % und 40.3 % drei Tage nach der dritten Behandlung über 90 % der Gesamtkernzahl aus.

Am 7. Versuchstag entspricht die Epidermisdicke mit $14.8/\mu\text{m}$ dem zweiten Versuchstag. Der durchschnittliche Volumenwert der Zellen beträgt $389/\mu\text{m}^3$ und liegt im Variationsbereich der Werte für die Kontrolltiere ($332 - 433/\mu\text{m}^2$).

Am 9. Versuchstag hat sich das Bild gegenüber dem 7. Versuchstag nur unwesentlich verändert.

Am 11. Versuchstag setzt sich die Gesamtkernzahl von 233 aus 65.1 % Basal-, 31.4 % Spinos-, 1.9 % Granulosakernen, 1.3 % degenerierten und 0.3 % mitotischen Kernen zusammen. Die Anteile der degenerierten und mitotischen Kerne entsprechen also den Werten für die unbehandelte Mäuseepidermis.

Am 14. Versuchstag beträgt die Epidermisdicke noch 12.9 ($11.7 - 13.4$)/ μm . Sie liegt damit nur knapp außerhalb der Variationsbreite der Werte für die Kontrolltiere ($10.6, 10.0 - 11.3/\mu\text{m}$). Der durchschnittliche Volumenwert der Zellen ist mit $443/\mu\text{m}^3$ um 15 % größer als bei den unbehandelten Kontrollen.

Am letzten Versuchstag entfallen folgende Anteile auf die verschiedenen Kerntypen (Werte der Kontrolltiere in Klammern beigefügt):

Basalkerne	68.2 (71.5) %
Spinosakerne	27.6 (25.3) %
Granulosakerne	2.4 (0.0) %
degenerierte Kerne	1.5 (2.9) %
mitotische Kerne	0.3 (0.3) %

Zusammenfassung der histometrischen Untersuchungsergebnisse
für Gruppe B (25 mg ZRK):

Die Ergebnisse lassen folgendes erkennen:

- Die Epidermisdicke erreicht am 4. Versuchstag das Maximum. Elf Tage nach der dritten Behandlung ist sie nur noch geringgradig größer als die unbehandelte Mäuseepidermis.
- Der höchste durchschnittliche Volumenwert der Zellen wird am 3. Versuchstag festgestellt. Am Ende des Versuches liegt der Volumenwert nur noch um 15 % über dem Wert für die Kontrolltiere.
- Die Gesamtzahl der Kerne nimmt am 4. und 5. Versuchstag deutlich zu. Am 14. Versuchstag entspricht sie nahezu der Gesamtzahl der Kerne bei den unbehandelten Kontrollen.
- Die Zahl der Basalkerne verändert sich im Versuchsverlauf unwesentlich. Der Anteil der Basalkerne an der Gesamtkernzahl ist am 3. Versuchstag am niedrigsten. Er steigt dann ständig an und liegt am letzten Versuchstag im Bereich der Kontrollwerte.
- Die Zahl der Spinosakerne nimmt im Verlauf der Behandlung bis zum 5. Versuchstag zu. Danach geht die Spinosakernzahl zurück. Am 14. Versuchstag entspricht ihr prozentualer Anteil an der Gesamtkernzahl annähernd dem für die Kontrollen.
- Die meisten Granulosakerne werden am 4. und 5. Versuchstag beobachtet. Am Ende des Versuches sind nur noch wenige Granulosakerne festzustellen.
- Die degenerierten Kerne erreichen schon am 2. Versuchstag

das Maximum. Vom 4. Versuchstag an liegen sie geringgradig unter dem für die unbehandelte Mäuseepidermis ermittelten Wert.

- Die Zahl der mitotischen Kerne ist am 3. Versuchstag absolut und relativ am größten in diesem Versuch. Nach dem 4. Versuchstag entspricht ihre Zahl der Anzahl der Mitosen in der unbehandelten Mäuseepidermis.

3.2.4 Ergebnisse der Varianzanalyse

Voraussetzung für die Durchführung einer Varianzanalyse ist, daß das Beobachtungsmaterial in den einzelnen Grundgesamtheiten, denen die Stichproben entstammen, normal verteilt ist. Diese Voraussetzung wird erfüllt, wie die Häufigkeitsverteilungen für Kerntypen und Epidermisflächen an den einzelnen Versuchstagen zeigen (nur für die Kontrolltiere wiedergegeben).

Für die Anwendung einer mehrfachen Varianzanalyse ist es weiterhin notwendig, daß alle Zeilen und Kolonnen vollständig sind. Diese Bedingung wird nur in einem Fall nicht erfüllt, nämlich am 9. Versuchstag in der Behandlungsgruppe A, in der nur vier Mäuse ausgewertet wurden. Der fehlende Wert (x) läßt sich nach Cavalli-Sforza, 1965 errechnen:

$$x = \frac{k \cdot K + z \cdot Z - T}{(k - 1)(z - 1)}$$

Dabei ist:

K die Kolonnen-(Spalten-) summe, die x enthält,

Z die Zeilensumme, die x enthält,

k die Anzahl der Kolonnen,

z die Anzahl der Zeilen und

T die Gesamtsumme aller Beobachtungen ohne x.

Der errechnete Wert für x wird in die freie Zeile eingetragen und die dreifache Varianzanalyse an den absoluten Zahlen durchgeführt.

Die Zahl der Freiheitsgrade insgesamt vermindert sich um den errechneten Wert, also um 1.

Die Werte von fünf zufällig ausgewählten Kontrolltieren (Zufallszahlen-Tabelle) werden als ein Versuchstag mit in die Varianzanalyse einbezogen. Damit erhöht sich die Zahl der Versuchstage von 9 auf 10.

Im folgenden werden die dreifachen Varianzanalysen getrennt für die untersuchten Kerntypen und die Epidermisflächen durchgeführt.

Basalkerne - Ergebnisse der dreifachen Varianzanalyse

Variabilität	SAQ	FG	s^2	F	P %
Versuchstage	29 142	9	3 238.0	29.0	<0.1
Dosen des ZRK	3 697	1	3 697.0	33.2	<0.1
Versuchstiere	420	4	105.0	0.9	>5.0
Wechselwirkungen:					
Versuchstage x Dosen	17 905	9	1 989.4	17.9	<0.1
Versuchstage x Versuchstiere	4 539	36	126.1	1.1	>5.0
Dosen x Versuchstiere	474	4	118.5	1.1	>5.0
Rest	3 899	35	111.4		
Insgesamt	60 076	98			

Erklärung der Abkürzungen der Varianzanalyse:

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

FG = Freiheitsgrade

s^2 = Varianz

F = Varianzenquotient

P = Wahrscheinlichkeit

Da ein Faktor (Versuchstiere) und zwei Wechselwirkungen (Versuchstage x Versuchstiere und Dosen x Versuchstiere) nicht

signifikant sind, das heißt, ihre Varianzen die durch den Zufall gegebene Größe nicht überschreiten, müssen sie zur Restvarianz hinzugezählt werden. Es muß deshalb ein neues Varianzschema aufgestellt werden, dessen Ergebnisse sich aber nur unwesentlich von denen des ersten Schemas unterscheiden.

Basalkerne - Ergebnisse der dreifachen Varianzanalyse
nach Reduzierung auf signifikante Varianzen

Variabilität	SAQ	FG	s ²	F	P %
Versuchstage	29 142	9	3 238.0	27.4	<0.1
Dosen des ZRK	3 697	1	3 697.0	31.3	<0.1
Wechselwirkung:					
Versuchstage x Dosen	17 905	9	1 989.4	16.8	<0.1
Rest	9 332	79	118.1		

Insgesamt	60 076	98			

Stark gesicherte Unterschiede bestehen bei den Basalkernen zwischen den Versuchstagen, den beiden ZRK-Dosen und der Wechselwirkung Versuchstage x Dosen. Im einzelnen ist festzustellen:

- Es ist bewiesen, daß sich die Anzahl der Basalkerne an den verschiedenen Versuchstagen signifikant unterscheidet.
- Die Basalkernzahl in der Epidermis ist abhängig von der Dosierung des Zigarettenrauchkondensates.
- Zwischen den Kernzahlen der Tiere des gleichen Versuchstages bestehen keine gesicherten Unterschiede. Daher können die Ergebnisse als Gruppenmittelwerte angegeben werden.
- Die Wechselwirkung Versuchstage x Dosen ist signifikant, was bedeutet, daß die beiden verwendeten Mengen des ZRK an gleichen Versuchstagen unterschiedliche Wirkungen zeigen.

Um festzustellen, zwischen welchen Versuchstagen gesicherte Unterschiede in der Anzahl der Basalkerne bestehen, wird der Tukey-Test durchgeführt.

Tukey-Test für Basalkerne:

r = Zahl der Werte jeder Gruppe = 5

v_1 = Anzahl der Mittelwerte (Versuchstage) = 10

v_2 = Restfreiheitsgrade = 79

s_o^2 = Restvarianz = 118.1

$q_{0.95}$ = oberer %-Wahrscheinlichkeitspunkt für
5 % Sicherheitswahrscheinlichkeit

$q_{0.99}$ = oberer %-Wahrscheinlichkeitspunkt für
1 % Sicherheitswahrscheinlichkeit

$\frac{s}{x}$ = mittlere Abweichung der Mittelwerte

$$\frac{s}{x} = \sqrt{\frac{s_o^2}{r}} = \sqrt{\frac{118.1}{5}} = 4.86$$

4.86 wird mit der Zahl der Werte pro Gruppe multipliziert, weil nicht Gruppenmittelwerte, sondern die Summen der einzelnen Gruppen verglichen werden:

$$4.86 \times 5 = 24.2$$

Dieses Ergebnis wird mit den Tabellenwerten für

$$q_{0.95} (10; 79) = 4.62 \text{ und}$$

$$q_{0.99} (10; 79) = 5.40 \text{ multipliziert.}$$

Daraus ergeben sich die Konfidenzintervalle von 112.3 und 131.2.

Werden nun die Basalkernsummen der einzelnen Versuchstage gesondert für die Behandlungsgruppen A (50 mg) und B (25 mg) verglichen, so ergibt sich folgendes Schema (- nicht signifikant, $P > 5.0\%$; + schwach signifikant, $P < 5.0\%$; ++ stark signifikant, $P < 1.0\%$):

Gruppe A	Versuchstag								
	2.	3.	4.	5.	6.	7.	9.	11.	14.
Kontrolle	++	++	+	-	-	-	-	-	-
2. Versuchstag		-	-	-	++	++	++	++	++
3. "			-	-	++	++	++	++	++
4. "				++	++	++	++	++	++
5. "					-	+	-	-	+
6. "						-	-	-	-
7. "							-	-	-
9. "								-	-
11. "									-

Gruppe B	Versuchstag								
	2.	3.	4.	5.	6.	7.	9.	11.	14.
Kontrolle	++	++	-	-	-	-	-	-	-
2. Versuchstag		++	++	++	++	++	++	++	++
3. "			++	++	++	++	++	++	++
4. "				-	-	-	-	-	-
5. "					-	-	-	-	-
6. "						-	-	-	-
7. "							-	-	-
9. "								-	-
11. "									-

Die Verminderung der Basalkernzahl läßt sich also in der Gruppe A für den 2. bis 4. Versuchstag und in der Gruppe B für den 2. und 3. Versuchstag gegen die Kontrollen sichern.

Für die weiteren Varianzanalysen werden nur noch das reduzierte Varianzschema und die Ergebnisse des Tukey-Tests angegeben.

Spinosakerne - Ergebnisse der dreifachen Varianzanalyse
nach Reduzierung auf signifikante Varianzen

Variabilität	SAQ	FG	s^2	F	P %
Versuchstage	58 307	9	6 478.6	4.63	<0.1
Rest	124 417	89	1 397.9		
Insgesamt	182 724	98			

Stark gesicherte Unterschiede bestehen bei den Spinosakernen nur zwischen den Versuchstagen, nicht aber zwischen den Dosen des ZRK. Deshalb wird der Tukey-Test für beide Behandlungsgruppen gemeinsam durchgeführt.

Für $r = 10$,

$v_1 = 10$,

$v_2 = 89$ ergeben sich die Konfidenzintervalle von 544.3 und 636.0.

Gruppe A und B	Versuchstag								
	2.	3.	4.	5.	6.	7.	9.	11.	14.
Kontrolle	-	-	-	++	++	++	-	-	-
2. Versuchstag		-	-	++	++	++	-	-	-
3. "			-	-	-	-	-	-	-
4. "				-	-	-	-	-	-
5. "					-	-	-	-	-
6. "						-	-	-	-
7. "							-	-	-
9. "								-	-
11. "									-

In beiden Behandlungsgruppen ist die Zunahme der Spinosakernzahl zwischen dem 5. und 7. Versuchstag gegen die Kontrollen gesichert.

Granulosakerne - Ergebnisse der dreifachen Varianzanalyse
nach Reduzierung auf signifikante Varianzen

Hierbei werden nur die Kernzahlen für die behandelten Tiere geprüft. Da sich bei den Kontrolltieren keine Granulosakerne feststellen lassen, sind somit im Vergleich zu den behandelten Mäusen ohnehin gesicherte Unterschiede vorhanden.

Variabilität	SAQ	FG	s^2	F	P %
Versuchstage	28 088	8	3 511.0	109.4	<0.1
Dosen des ZRK	1 131	1	1 131.0	35.2	<0.1
Wechselwirkung:					
Versuchstage x Dosen	1 693	8	211.6	6.6	<0.1
Rest	2 276	71	32.1		

Insgesamt	33 188	88			

Nach dem Ergebnis der Varianzanalyse läßt sich folgendes sagen:

- Die unterschiedliche Anzahl der Granulosakerne an den verschiedenen Versuchstagen ist statistisch gesichert.
- Die Anzahl der Granulosakerne in der Epidermis ist von der verwendeten Kondensatmenge abhängig.
- Die beiden Dosen des ZRK beeinflussen die Granulosakernzahl an gleichen Versuchstagen unterschiedlich.

Tukey-Test für Granulosakerne:

Für $r = 5$,

$v_1 = 9$,

$v_2 = 71$ ergeben sich Konfidenzintervalle
von 57.5 und 67.6.

Die Ergebnisse für die Behandlungsgruppen A und B werden im nachfolgenden Schema zusammengestellt:

Gruppe A		Versuchstag							
		3.	4.	5.	6.	7.	9.	11.	14.
2.	Versuchstag	++	++	++	++	++	-	-	-
3.	"		++	++	+	-	-	-	++
4.	"			++	-	++	++	++	++
5.	"				++	++	++	++	++
6.	"					-	++	++	++
7.	"						-	+	++
9.	"							-	-
11.	"								-

Gruppe B		Versuchstag							
		3.	4.	5.	6.	7.	9.	11.	14.
2.	Versuchstag	++	++	++	++	-	-	-	-
3.	"		++	++	-	++	++	++	++
4.	"			-	++	++	++	++	++
5.	"				++	++	++	++	++
6.	"					++	++	++	++
7.	"						-	-	-
9.	"							-	-
11.	"								-

Die Zunahme der Granulosakernzahl zwischen dem 3. und 7. Versuchstag in der Gruppe A und zwischen dem 3. und 6. Versuchstag in der Gruppe B läßt sich gegen die Kernzahl des 2. Versuchstages statistisch sichern.

Degenerierte Kerne - Ergebnisse der dreifachen Varianz-
analyse nach Reduzierung auf signifikante Varianzen

Variabilität	SAQ	FG	s^2	F	P %
Versuchstage	2 057	9	228.6	20.8	<0.1
Dosen des ZRK	378	1	378.0	34.4	<0.1
Wechselwirkung:					
Versuchstage x Dosen	423	9	47.0	4.3	<0.1
Rest	870	79	11.0		

Insgesamt	3 728	98			

Stark gesicherte Unterschiede sind zwischen den Versuchstagen, den Dosen des Kondensates und der Wechselwirkung Versuchstage x Dosen festzustellen.

In der Behandlungsgruppe A ist die Zahl der degenerierten Kerne gegenüber der der Kontrolltiere am 3. Versuchstag stark und am 4. Tag schwach gesichert. In der Gruppe B lassen sich die Kernzahlen an keinem Versuchstag gegenüber denen der Kontrolltiere sichern. Am 2. und 3. Versuchstag liegt die Zahl der degenerierten Kerne jedoch so weit im oberen Streuungsbereich der Kontrollzahlen, daß sich diese Zahlen gegen die der folgenden Versuchstage, die im unteren Streuungsbereich liegen, statistisch sichern lassen.

Mitotische Kerne - Ergebnisse der dreifachen Varianzanalyse nach Reduzierung auf signifikante Varianzen

Diese Varianzanalyse wird mit den absoluten Zahlen der in 4000 μ m Epidermislänge gezählten mitotischen Kernen durchgeführt.

Variabilität	SAQ	FG	s ²	F	P %
Versuchstage	508	9	56.4	14.1	<0.1
Wechselwirkungen:					
Versuchstage x Dosen	358	9	38.8	9.7	<0.1
Dosen x Versuchstiere	66	4	16.5	4.1	<1.0
Rest	306	76	4.0		
Insgesamt	1 238	98			

Die Ergebnisse der Kernzählung (mitotische Kerne) an verschiedenen Versuchstagen unterscheiden sich gesichert voneinander. Dagegen sind statistisch zwischen den Mitosenzahlen der Gruppen A und B keine gesicherten Unterschiede festzustellen. Da trotzdem die Wechselwirkung Versuchstage x Dosen signifikant ist, müssen die beiden ZRK-Dosierungen auf die Mitosenzahl einzelner Versuchstage einen unterschiedlichen Einfluß haben.

Tukey-Test für mitotische Kerne:

Für $r = 5$,

$v_1 = 10$ und

$v_2 = 76$ ergeben sich Konfidenzintervalle von 20.6 und 24.0.

Gruppe A		Versuchstag								
		2.	3.	4.	5.	6.	7.	9.	11.	14.
Kontrolle		-	-	++	++	-	-	-	-	-
2. Versuchstag			-	++	++	-	-	-	-	-
3. "				-	++	-	-	-	-	-
4. "					-	-	+	-	++	++
5. "						+	++	++	++	++
6. "							-	-	-	-
7. "								-	-	-
9. "									-	-
11. "										-

Gruppe B		Versuchstag								
		2.	3.	4.	5.	6.	7.	9.	11.	14.
Kontrolle		++	++	+	-	-	-	-	-	-
2. Versuchstag			+	-	-	+	+	-	-	+
3. "				++	++	++	++	++	++	++
4. "					-	+	+	-	-	-
5. "						-	-	-	-	-
6. "							-	-	-	-
7. "								-	-	-
9. "									-	-
11. "										-

In der Gruppe A kann die Zahl der mitotischen Kerne am 4. und 5. Versuchstag gegen die der Kontrolle gesichert werden. In der Gruppe B ist die Mitosezahl des 2., 3. und 4. Versuchstages von der der Kontrollen signifikant unterschieden.

Epidermisflächen--Ergebnisse der dreifachen Varianzanalyse
nach Reduzierung auf signifikante Varianzen

Die Varianzanalyse wird mit den nicht in μm^2 umgerechneten Planimeterwerten (cm^2) durchgeführt, um für die Berechnung übersichtliche Zahlen zu erhalten.

Variabilität	SAQ	FG	s^2	F	P %
Versuchstage	719 960	9	79 995.6	176.7	<0.1
Dosen des ZRK	75 020	1	75 020.0	165.7	<0.1
Wechselwirkung:					
Versuchstage x Dosen	41 412	9	4 601.3	10.2	<0.1
Rest	35 763	79	452.7		
Insgesamt	872 155	98			

Stark gesichert sind die Unterschiede für die Epidermisflächen und damit gleichzeitig für die Epidermisdicke zwischen den Versuchstagen, den Dosen des ZRK und der Wechselwirkung Versuchstage x Dosen.

- Es ist also bewiesen, daß sich die Epidermisdicken an verschiedenen Versuchstagen signifikant voneinander unterscheiden.
- Die Zunahme der Epidermisdicke ist abhängig von der applizierten Dosis des Zigarettenrauchkondensates.
- Gesicherte Unterschiede zwischen den Versuchstieren des gleichen Versuchstages bestehen nicht.
- Die beiden Dosen des Kondensates rufen an einzelnen Tagen eine unterschiedliche Epidermisdickenzunahme hervor.

Tukey-Test für Epidermisflächen:

$$r = 5$$

$$v_1 = 10$$

$$v_2 = 79$$

Es ergeben sich Konfidenzbereiche von 219.0 und 256.0.

Gruppe A	Versuchstag								
	2.	3.	4.	5.	6.	7.	9.	11.	14.
Kontrolle	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2. Versuchstag		++	++	++	++	++	-	-	+
3. "			++	++	++	-	+	-	++
4. "				+	-	++	++	++	++
5. "					++	++	++	++	++
6. "						++	++	++	++
7. "							++	++	++
9. "								-	++
11. "									++

Gruppe B	Versuchstag								
	2.	3.	4.	5.	6.	7.	9.	11.	14.
Kontrolle	++	++	++	++	++	++	++	++	-
2. Versuchstag		++	++	++	++	-	-	-	-
3. "			++	++	++	++	++	++	++
4. "				-	++	++	++	++	++
5. "					++	++	++	++	++
6. "						++	++	++	++
7. "							-	-	-
9. "								-	-
11. "									-

In der Gruppe A ist die Dickenzunahme der Epidermis für alle Versuchstage stark gegen die der Kontrolltiere gesichert. In der Gruppe B unterscheidet sich die Dicke der Epidermis am letzten Versuchstag statistisch nicht von der Epidermisdicke bei den nicht mit Kondensat behandelten Mäusen.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Varianzanalyse

- Gesicherte Unterschiede bestehen für die Kerntypen und die Epidermisdicke an verschiedenen Versuchstagen.
- Die Zahl der Basal- und Granulosakerne sowie die der degenerierten Kerne und die Zunahme der Epidermisdicke sind abhängig von der Dosierung des Zigarettenrauchkondensates.
- Für die Zahl der Spinosakerne und der mitotischen Kerne lassen sich keine Unterschiede zwischen den Dosen des Kondensates feststellen.
- Die für die Versuchstiere des gleichen Versuchstages ermittelten Werte unterscheiden sich statistisch nicht.
- Statistisch gesichert ist die Abnahme der Basalkernzahl am 2. bis 4. Versuchstag in der Gruppe A und am 2. und 3. Versuchstag in der Gruppe B.
- Die Zunahme der Zahl der Spinosakerne zwischen dem 5. und 7. Versuchstag ist für beide Dosen des ZRK im Vergleich zu den Kontrollen signifikant.
- Die Granulosakernzahl unterscheidet sich in der Gruppe A zwischen dem 3. bis 7. Versuchstag und in der Gruppe B zwischen dem 3. bis 6. Versuchstag jeweils gesichert von der Granulosakernzahl des 2. Versuchstages.
- Die Zunahme der Zahl der degenerierten Kerne ist nur für die mit 50 mg Kondensat behandelten Mäuse der Gruppe A statistisch gesichert.
- Der Anstieg der Mitosenzahl am 4. und 5. Versuchstag in Gruppe A und am 2., 3. und 4. Versuchstag in Gruppe B ist gegen die Kontrollen gesichert.
- Die Epidermisdicke unterscheidet sich in Gruppe A an allen Versuchstagen und in der Gruppe B vom 2. bis 11. Versuchstag signifikant von der Epidermisdicke der Kontrolltiere.

4. Besprechung der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur

Fünfzehn Kontrolltiere wurden einen Tag vor Versuchsbeginn geschoren und am 2., 6. und 12. Versuchstag getötet. Die allgemeine histologische Beurteilung der Haut, die Häufigkeitsverteilung der Kernzahlen und der Epidermisdicke sowie die statistische Beurteilung der Untersuchungsergebnisse zeigten keine Unterschiede zwischen den an verschiedenen Versuchstagen getöteten Mäusen.

Eine Behandlung der Kontrolltiere nur mit Aceton, dem Lösungsmittel des ZRK, erfolgte nicht, da GLÜCKSMANN, 1945 und DONTENWILL et al., 1965 nach wenigen Behandlungen mit Aceton keine Veränderungen an der Mäusehaut beobachteten.

Die von DAMMERT (1957) und MERENMIES (1959) nach gleichartigen Grundsätzen ermittelten Kernzahlen in der Epidermis unbehandelter Mäuse stimmen gut mit meinen Ergebnissen überein (Tabelle 8).

Tabelle 8: Vergleich der prozentualen Anteile der Kerntypen an der Gesamtkernzahl in der unbehandelten Mäuseepidermis

Kerntyp	Eigene Untersuchungsergebnisse	Dammert 1957	Merenmies 1959
	Mittelwerte (%)		
Basalkerne	71.5	69.0	69.0
Spinosakerne (= differenzierte Kerne)	25.3	25.0	22.0
Granulosakerne	0.0	-- *)	-- *)
Degenerierte Kerne	2.9	6.1	8.0
Mitotische Kerne	0.3	0.0	0.1

*) Granulosakerne wurden nicht ausgewertet

In der Epidermis unbehandelter haarloser Mäuse fand IVERSEN (1964) 60 % Basalkerne und 40 % differenzierte Kerne.

Geringfügige Differenzen zwischen den eigenen und den von DAMMERT und MERENMIES veröffentlichten Ergebnissen bestanden lediglich in den Anteilen der degenerierten und mitotischen Kerne an der Gesamtkernzahl. Dafür sind vermutlich individuelle Unterschiede bei der Anwendung der Untersuchungskriterien und Abweichungen im Tiermaterial verantwortlich zu machen.

Granulosakerne wurden von mir bei den Kontrollen nicht festgestellt. Das lag daran, daß nur die Kerne von Zellen mit deutlichen Keratohyalin granula im Zytoplasma als Granulosakerne angesprochen wurden. Mit der engen Festlegung des Begriffes "Granulosakern" ließen sich zwar diese Kerntypen in der Epidermis der behandelten Mäuse mit starker Keratinisierung gut erfassen, nicht aber in der nur geringgradig verhornenden Epidermis der Kontrollen. Die Schwierigkeiten bei der Zählung von Granulosakernen hielten DAMMERT und MERENMIES für so groß, daß sie auf eine Auswertung gänzlich verzichteten.

Bei der Behandlung der Mäusehaut mit chemisch definierten Karzinogenen stellten PULLINGER (1941) und IVERSEN und EVENSEN (1962) fest, daß es nach Unterschreitung einer kritischen Dosis nicht zu den für das verwendete Karzinogen charakteristischen Veränderungen an der Haut kommt. In den eigenen Versuchen führte die Applikation von 25 mg und 50 mg ZRK zu qualitativ gleichartigen Reaktionen an Epidermis und Korium. Eine kritische Schwelle dürfte also mit den gewählten Dosen des ZRK nicht unterschritten worden sein.

Auf Grund der allgemeinen histologischen Beurteilung waren quantitative Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen A (50 mg) und B (25 mg) zu erkennen. Die Stärke der Zellschädigung und Ödematisierung, der Grad der Talgdrüsendegeneration und die Dickenzunahme der Epidermis waren abhängig von der applizierten Menge des ZRK.

Mit Hilfe des sogenannten "Talgdrüzenschwundtests" und des "Hyperplasie-Tests" konnten SUNTZEFF et al. (1957), GUERIN und CUZIN (1961), KRACHT et al. (1961) und LAZAR et al. (1966) ebenfalls Dosisunterschiede an der mit Zigarettenrauchkondensat behandelten Haut von Mäusen feststellen.

Eine weitere Differenzierung zwischen den Gruppen A und B war durch die histometrische Analyse der Epidermis und die statistische Beurteilung der Versuchsergebnisse möglich. Der Rückgang der prozentualen Basalkernzahl und das gleichzeitige Anwachsen der Zahl der degenerierten Kerne und der Granulosakerne war in Gruppe A stärker ausgeprägt als in Gruppe B. Die unterschiedliche Beeinflussung dieser Kerntypen durch zwei Dosierungen des ZRK ist statistisch hochsignifikant gesichert. In der Phase der Zellschädigung konnten also Dosis-Wirkungsbeziehungen nachgewiesen werden.

Dagegen erfolgte die Zellproliferation in beiden Behandlungsgruppen qualitativ und quantitativ gleichartig. Weder für die Zahl der mitotischen Kerne noch für die Spinosakernzahl bestanden statistisch gesicherte Unterschiede. Die Gesamtkernzahl in der Epidermis wuchs bis zum 5. Versuchstag in beiden Gruppen um den gleichen Betrag an.

DONTENWILL et al. (1965) stellten fest, daß die Steigerung der Zellproliferation nach wenigen Behandlungen mit ZRK nicht eindeutig dosisabhängig ist.

Unterschiede zwischen den Gruppen A und B waren vor allem im zeitlichen Ablauf der Veränderungen an der Epidermis zu beobachten. Bei Behandlung mit der niedrigen Dosis setzten die Umbauvorgänge an der Epidermis regelmäßig 24 bis 48 Stunden früher ein als bei der Applikation von 50 mg des ZRK. Das war nicht nur an der Lage der Maxima und Minima für die Kernzahlen im Versuchsverlauf, sondern auch an der Veränderung der Epidermisdicke, den durchschnittlichen Volumenwerten der Zellen und der Gesamtkernzahl zu erkennen. Die Rückbildung der Veränderungen begann in der Gruppe B ebenfalls früher als in Gruppe A. Daher entsprachen die

Befunde nach der Applikation von 25 mg des ZRK am letzten Versuchstag weitgehend denen der Kontrolltiere, während für die Gruppe A (50 mg) der Versuchszeitraum nicht ausreichte, um die Schäden an der Epidermis vollständig zu beseitigen.

Obwohl Unterschiede in der Wirkung der beiden Dosen des ZRK festgestellt wurden, beruhten die Veränderungen in der Epidermis auf grundsätzlich gleichen Vorgängen.

Es wurden zwei Phasen der Veränderungen beobachtet: die Phase der Zellschädigung und die der Zellproliferation. Die Phase der Zellschädigung war charakterisiert durch den Untergang von Zellen (Epidermisnekrose, Degeneration der Talgdrüsen, Zunahme der Zahl der degenerierten Kerne) und die Schwellung der Hautstrukturen (intra- und extrazelluläres Ödem, Schwellung der kollagenen Fasern im Korium). Die Gesamtkernzahl in der Epidermis blieb am 2. und 3. Versuchstag konstant. Trotzdem wuchs die Epidermis bis zum 4. Versuchstag auf das Zweieinhalbfache ihrer normalen Dicke an.

Gleiche Befunde wurden von PULLINGER (1940), GLÜCKSMANN (1945), SETÄLÄ et al. (1957), DAMMERT (1957) und MERENMIES (1959) nach einer Behandlung mit chemisch definierten Karzinogenen erhoben. LAZAR und Mitarbeiter (1963) sahen ähnliche Veränderungen nach einer Applikation von ZRK. Die rasche Zunahme der Epidermisdicke in der Phase der Zellschädigung wurde lediglich durch die Schwellung der Zellen und die Ausdehnung der interzellulären Spalten hervorgerufen. Dieser Vorgang spiegelt sich auch im Anwachsen der durchschnittlichen Volumenwerte der Zellen wieder.

Die Anwendung der von MERENMIES (1959) angegebenen Formel zur Berechnung der Volumenwerte ist an die Bedingung geknüpft, daß sich die Zellen frei nach allen Richtungen ausdehnen können.

Inwieweit diese Voraussetzung uneingeschränkt für die Zellen der Epidermis gilt, ist auf Grund der durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig zu

klären. Doch läßt sich aus der Zunahme der durchschnittlichen Kernabstände in der Epidermis vermuten, daß diese Möglichkeit durchaus vorhanden ist. Der durchschnittliche Volumenwert veranschaulicht zwar die Volumenänderungen der Zellen, er ist jedoch keine genaue Angabe für die Zellgröße. Denn im Volumenwert der Zellen ist die Vergrößerung der interzellulären Räume durch Ödematisierung mit enthalten.

Direkte Folge der Zellschädigung war die Zunahme der Spinos- und der Granulosakernzahl. Die während der Behandlung geschädigten Basalzellen differenzierten sich also schneller als normal und wurden verstärkt an die Hautoberfläche abgestoßen.

Eine starke Zunahme der Spinosakernzahl wurde von SETÄLÄ et al. (1957, 1959), DAMMERT (1957) und MERENMIES (1959) als bezeichnend für die Wirkung nichtkarzinogener Promotersubstanzen angesehen. Auch ELGJO (1968) fand, daß die Wachstumsvorgänge in der Epidermis nach einmaliger Applikation von ZRK denen bei der Behandlung mit nichtkarzinogenen Stoffen entsprechen. Er vermutet, daß die verwendete Kondensatmenge zu gering war, um den Effekt eines Karzinogens an der Epidermis hervorzurufen.

Erstes Zeichen für den Beginn der Proliferationsphase war das Anwachsen der Mitosenzahl auf das Zwei- bis Vierfache im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Da die Mitosedauer nicht bestimmt wurde, ist nach ELGJO (1966) die Zunahme der Mitosenzahl kein Indikator für intensive Zellerneuerungsprozesse.

Vom gleichen Autor wurde 1968 jedoch festgestellt, daß vier unterschiedlich auf die Epidermis wirkende Zigarettenrauchkondensate gleiche Teilungsaktivität in den Basalzellen auslösten.

Bei Verkürzung der Mitosedauer um die Hälfte erreichte die Mitoserate am 2. bis 4. Versuchstag das Maximum.

Es besteht also Berechtigung für die Annahme, daß die Mitosedauer auch in den eigenen Versuchen verkürzt war. Damit wäre der Anstieg der Mitosenzahl doch ein Zeichen für intensive Wachstumsprozesse in der Epidermis.

Die weitere Zunahme der Epidermisdicke nach dem 4. Versuchstag, in der Proliferationsphase, war eindeutig durch eine Vermehrung der Gesamtzellzahl bedingt.

Die Epidermishyperplasie ist nach IVERSEN und EVENSEN (1962), IVERSEN und BJERKNES (1963), IVERSEN (1968), IVERSEN, BJERKNES und DEVIK (1968) das Ergebnis eines regenerativen Prozesses nach einer Epidermisverletzung durch die Behandlung. Nur in Art und Stärke der Epidermisschädigung ist eine direkte Wirkung des applizierten Karzinogens zu erkennen. Alle übrigen Vorgänge, wie Zunahme der Kernzahl, der Epidermisdicke und der erhöhte Zellverlust auf die Hautoberfläche sind nur Folgen dieser Schädigung.

IVERSEN's Erklärung der Vorgänge in der Epidermis trifft m.E. auch auf die Veränderungen zu, die ich nach Applikation von ZRK an der Epidermis der Maus beobachten konnte. Diese Veränderungen scheinen keinesfalls nur für die Mäuseepidermis typisch zu sein. Denn PINKUS (1952) stellte nach einmaliger physikalischer Schädigung der menschlichen Epidermis (Abziehen der oberflächlichen Zellschichten) fest, daß eine Schädigung begrenzten Ausmaßes, abhängig vom Grad der Schädigung, eine Proliferation der Epidermis hervorruft, die es gestattet, die beschädigten Zellagen abzustoßen. Gleichartige Beobachtungen machten OEHLERT et al. (1966) und FEIT und Mitarbeiter (1967) nach einer Behandlung mit MC oder BP an der Epidermis des Schweines.

Am 7. Versuchstag, also vier Tage nach der dritten Applikation mit ZRK, setzten in meinen Versuchen die Rückbildungsvorgänge an der Epidermis ein.

Das gestörte Verhältnis von Basal- und Spinosakernen verschob sich langsam wieder zugunsten der Basalkerne. Die Epidermisdicke und die Kernzahl in der Epidermis nahmen stetig ab. Nach IVERSEN (1964) lag die Kernzahl drei Wochen nach einer Behandlung mit Methylcholanthren wieder im Normalbereich.

Nach einer Versuchsdauer von 14 Tagen waren am eigenen Material die Rückbildungsvorgänge an der Epidermis noch nicht völlig abgeschlossen. Etwa drei Wochen nach der 3. Kondensatapplikation wäre aber mit einem Zustand der Epidermis zu rechnen, welcher dem Normalbefund unbehandelter Mäuse entspräche.

5. Zusammenfassung

Je 45 ICI-ASL-Mäusen wurden 50 mg oder 25 mg eines in 0.3 ml Aceton/Wasser (9:1) gelösten Zigarettenrauchkondensates an drei aufeinanderfolgenden Tagen auf die geschorene Rückenhaut aufgetragen. Fünfzehn unbehandelte, aber geschorene Mäuse dienten als Kontrolle. Gruppen von je 5 Tieren wurden zeitlich gestaffelt bis zum 14. Versuchstag getötet.

Im Behandlungsgebiet wurde die Haut histologisch und die Epidermis histometrisch untersucht.

Nach ausführlicher statistischer Prüfung mit der dreifachen Varianzanalyse können die Ergebnisse wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Die Haut der Kontrolltiere wird durch die Schur des Rückenhaares am Versuchsbeginn nicht beeinflusst. Kernzählungen ergeben in der Epidermis der Kontrollen 71.5 % Basalkerne, 25.3 % Spinosakerne, 2.9 % degenerierte und 0.3 % mitotische Kerne. Granulosakerne werden bei den unbehandelten Mäusen nicht beobachtet.
2. Durch die Behandlung mit Zigarettenrauchkondensat kommt es zu Epidermisnekrose, Ödematisierung, Zunahme der Zahl der degenerierten Kerne, Infiltration mit Granulozyten und Lymphozyten und zur Degeneration der Talgdrüsen.
3. Durch intra- und extrazelluläres Ödem wächst die Epidermisdicke bis zum 4. Versuchstag auf das Zweieinhalbfache im Vergleich zu den Kontrollen an. Ausdruck der Schwellung ist außerdem die Zunahme der durchschnittlichen Volumenwerte der Zellen.
4. In der Phase der Zellschädigung wird ein verstärkter Zellverlust an der Hautoberfläche festgestellt. Dieser ist

gekennzeichnet durch eine Zunahme der Spinos- und Granulosakernzahlen und die Dickenzunahme der Hornschicht.

5. In der Phase der Zellschädigung ist die Stärke der Veränderungen an Epidermis und Korium von der Menge des applizierten Zigarettenrauchkondensats abhängig.
6. Nach dem 4. Versuchstag kommt es zu einer Proliferation der Epidermiszellen. Diese Phase ist gekennzeichnet durch das Ansteigen der mitotischen Aktivität in den Basalzellen, die Zunahme der Gesamtkernzahl in der Epidermis und ein weiteres Anwachsen der Epidermisdicke am 5. Versuchstag.
7. Quantitative Unterschiede in der Wirkung der beiden Dosen (A und B) des Zigarettenrauchkondensates sind in der Proliferationsphase nicht stark ausgeprägt. Deutlich unterscheiden sich die Behandlungsgruppen dagegen im zeitlichen Ablauf der Veränderungen an der Epidermis. Die Befunde an Epidermis und Korium entsprechen nach Applikation von 25 mg am letzten Versuchstag weitgehend denen der unbehandelten Mäuse. Bei mit 50 mg Kondensat behandelten Tieren reicht der Versuchszeitraum nicht für eine Normalisierung der Epidermisbefunde aus. Spuren der Behandlung lassen sich noch 11 Tage nach der dritten ZRK-Applikation an der Epidermis feststellen.
8. Die Vorgänge in der Epidermis nach Behandlung mit Zigarettenrauchkondensat werden als regenerative Prozesse nach einer Zellschädigung gedeutet.

6. Literaturverzeichnis

1. BOCK, F.G.: Early effects of hydrocarbons on mammalian skin.
In: HOMBURGER, F.: Progr. exp. Tumor Res.
4, Karger, Basel/New York 1964, S. 126-168.
2. BOCK, F.G., MOORE, G.E. und P.C. CLARK: 1965, zit. nach
WYNDER und HOFFMANN, 1967.
3. CAVALLI-SFORZA, L.: Grundbegriffe der Biometrie.
Fischer, Jena 1965.
4. DAMMERT, K.: Zur Histologie der chemischen Hautcarcinogenese im Lichte der Zweiphasenhypothese untersucht an Mäusen.
Acta path. microbiol. Scand., Suppl. 124, 1957.
5. DONTENWILL, W. CHRISTOFORIS, A., WIEBECKE, B. und P. FEAUX
De LA CROIX: Vergleichende autoradiographische Untersuchungen über die Wirkung von Carcinogenen, Zigarettenrauchkondensaten und Lösungsmitteln auf die Mäusehaut.
Z. Krebsforsch. 66, 466-472, 1965.
6. DUSTIN, P.: 1959, zit. nach IVERSEN und EVENSEN, 1962.
7. ELGJO, K.: Epidermal cell population kinetics in chemically induced hyperplasia.
Scandinavian university books, Oslo/
Copenhagen/Stockholm 1966.
8. ELGJO, K.: Growth kinetics of the mouse epidermis after a single application of cigarette smoke condensates.
Acta path. microbiol. Scand. 73, 316-322, 1968.
9. FEIT, J., BUSCHER, H. und W. OEHLERT: Das Verteilungsmuster und die Verweildauer radioaktiv markierter carcinogener Kohlenwasserstoffe in der Schweinehaut.
Beitr. path. Anat. 136, 33-49, 1967.
10. GLÜCKSMANN, A.: The histogenesis of benzopyrene- induced epidermal tumors in the mouse.
Cancer Res. 5, 385-400, 1945.

11. GUERIN, M. und J. CUZIN: Tests cutanés chez la souris pour déterminer l'activité carcinogène des goudrons de fumée de cigarettes.
Bull. Ass. franç. Cancer 48, 112-121, 1961.
12. HAUG, H.: Probleme und Methoden der Strukturzählung im Schnittpräparat.
In: WEIBEL, E.R. und H. ELIAS: Quantitative methods in morphology. Springer, Berlin/Heidelberg/New York 1967, S. 58-78.
13. IVERSEN, O.H. und A. EVENSEN: Experimental skin carcinogenesis in mice.
Acta path. microbiol. Scand., Suppl. 156, 1962.
14. IVERSEN, O.H. und R. BJERKNES: Kinetics of Epidermal reaction to carcinogens.
Acta path. microbiol. Scand., Suppl. 165, 1963.
15. IVERSEN, O.H.: Discussion on cell destruction and population dynamics in experimental skin carcinogenesis in mice.
In: HOMBURGER, F.: Progr. exp. Tumor Res. 4, Karger, Basel/New York 1964, S. 169-206.
16. IVERSEN, O.H., BJERKNES, R. und F. DEVIK: Kinetics of cell renewal, cell migration and cell loss in the hairless mouse dorsal epidermis.
Cell and Tissue Kinetics, 1, 351-367, 1968.
17. IVERSEN, O.H.: Wachstumsregulierung und Krebsentwicklung in der Epidermis von Mäusen.
Arch. Geschwulstforsch. 32, 322-338, 1968.
18. IVERSEN, U., IVERSEN, O.H. und R. BJERKNES: A comparison of the tumorigenic effect of five graded doses of 3-methyl-cholanthrene applied to the skin of hairless mice at intervals of 3 or 14 days.
Acta path. microbiol. Scand. 73, 502-520, 1968.
19. KLEIN, U.E.: Methoden zur Schnelltestung cancerogener Substanzen.
Beitr. Tabakforsch. 1, 55-62, 1961.

20. KRACHT, J., KLEIN, U.E. und M. BAGHIRZADE: Erfahrungen mit dem Talgdrüsenchwundtest.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 45. Tagg. 1961,
S. 170-174.
21. LAZAR, P., LIBERMANN, C., CHOUROULINKOV, I. und M. GUERIN:
Tests sur la peau de souris pour la détermination des activités carcinogènes: Mise au point méthodologique.
Bull. Ass. franç. Cancer 50, 567-577, 1963.
22. LAZAR, P., CHOUROULINKOV, I., LIBERMANN, C. und GUERIN:
Benzo(a)pyrene content and carcinogenicity of cigarette smoke condensate-results of short-term and long-term tests.
J. Nat. Cancer Inst. 37, 573-576, 1966.
23. LEBLOND, C.P.: 1951, zit. nach DAMMERT, 1957.
24. LINDER, A.: Statistische Methoden.
Birkhäuser, Basel/Stuttgart 1960.
25. MERENMIES, L.: Zum Mechanismus der Hauttumorbildung bei Mäusen.
Acta path. microbiol. Scand., Suppl. 130, 1959.
26. OEHLERT, W., KARASEK, J. und H. BERTELMANN: Untersuchungen zur normalen und gesteigerten Zellneubildung im mehrschichtigen Plattenepithel der Schweineepidermis.
Beitr. path. Anat. 134, 395-406, 1966.
27. PINKUS, H.: Examination of the epidermis by the strip method II. Biometric data on regeneration of the human epidermis.
J. Invest. Dermat. 19, 431-446, 1952.
28. PULLINGER, B.D.: The first effects on mouse skin of some polycyclic hydrocarbons.
J. Path. Bact. 50, 463-471, 1940.

29. PULLINGER, B.D.: Correlation between carcinogenic potency and the first skin reaction to certain hydrocarbons.
J. Path. Bact. 53, 287-288, 1941.
30. SETÄLÄ, K., DAMMERT, K., SETÄLÄ, H., MERENMIES, L. und P. HOLSTI: Morphologische Hautveränderungen bei Mäusen, hervorgerufen durch nichtionisierbare oberflächenaktive tumorauslösende ("tumour promoting") Substanzen.
Z. Krebsforsch. 61, 548-568, 1957.
31. SETÄLÄ, K., MERENMIES, L., STJERNVALL, L., AHO, Y. und P. KAJANNE: Mechanism of experimental tumorigenesis. I. Epidermal hyperplasia in mouse caused by locally applied tumor initiator and dipole-type tumor promotor.
J. Nat. Cancer Inst. 23, 925-951, 1959.
32. SUNTZEFF, V., CRONINGER, A., WYNDER, E.L., COWDRY, E.V. und E.A. GRAHAM: Use of sebaceous gland test of primary cigarette-tar fraction and of certain noncarcinogenic polycyclic hydrocarbons.
Cancer (Philad.) 10, 250-254, 1957.
33. WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik.
Fischer, Jena 1964.
34. WYNDER, E.L. und D. HOFFMANN: Tobacco and tobacco smoke.
Academic Press, New York/London 1967.
35. WYNDER, E.L. und D. HOFFMANN: Experimental tobacco carcinogenesis.
Science 162, 862-871, 1968.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Weiß
für die freundliche Unterstützung bei der Wahl
des Themas und bei der Durchführung der Arbeit.

Für die Förderung des Vorhabens danke ich
der Direktion des Battelle-Instituts e.V.,
Frankfurt am Main sowie Herrn Privatdozent
Dr. Eder und Herrn Dr. Hofmann.

Lebenslauf

Als Sohn des Tierarztes Paul Militzer und seiner Ehefrau Hilde, geb. Zeitschel, wurde ich am 5.8.1940 in Leipzig geboren.

Volksschulen besuchte ich von 1947 bis 1955 in Bad Köstritz, Auma und Neustadt an der Orla. Nach vier Jahren Oberschulzeit bestand ich 1959 die Reifeprüfung in Neustadt.

Um Veterinärmedizin studieren zu dürfen, arbeitete ich ein Jahr in der Landwirtschaft und in den zoologischen Gärten von Leipzig und Berlin-Friedrichsfelde.

Mit meinen Eltern verließ ich 1960 Mitteldeutschland. Nach einem Jahr Sonderkurs in Hanau wurde ich 1961 zum Studium in der Bundesrepublik zugelassen. Ab Wintersemester 1961/62 studierte ich Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität Giessen. Nach neun Studiensemestern legte ich im Sommer 1966 vor dem Prüfungsausschuß in Giessen die Tierärztliche Prüfung ab. Als Veterinärpraktikant arbeitete ich in der Chirurgischen, Medizinischen, Ambulatorischen und Geburtshilflichen Klinik sowie am Schlachthof in Giessen.

Am 9. April 1967 erhielt ich die Approbation als Tierarzt. Seit Mai 1967 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Battelle-Institut e.V. in Frankfurt am Main beschäftigt.

